

Aus der Abteilung für Klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
(Vorstand: Prof. Dr. med. F. Scheiffarth)

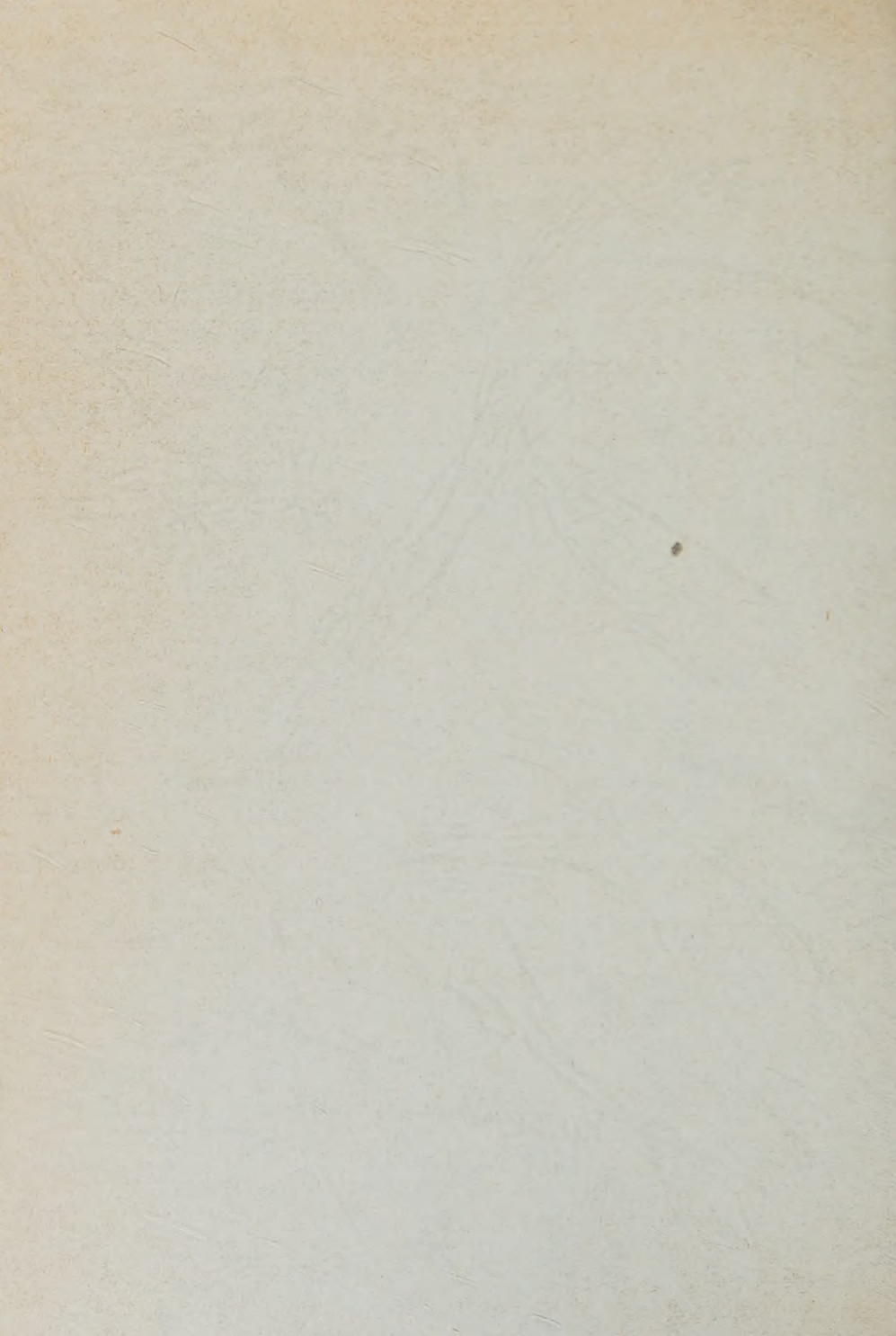
Nachweis des Auftretens antierythrozytärer
Immunglobuline auf zellulärer Ebene bei der
Malariainfektion der Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Ernst Fink
aus München



**Aus der Abteilung für Klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
(Vorstand: Prof. Dr. med. F. Scheiffarth)**

Nachweis des Auftretens antierythrozytärer Immunglobuline auf zellulärer Ebene bei der Malariainfektion der Maus

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

vorgelegt von

**Dr. rer. nat. Ernst Fink
aus München**

Dekan : Prof. Dr. med. L. Demling

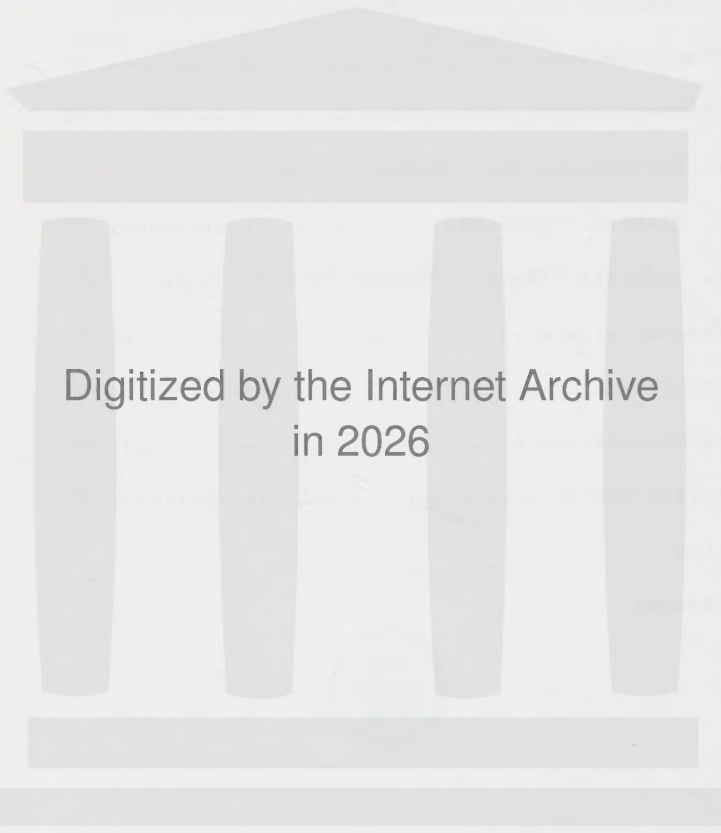
Referent : Prof. Dr. med. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung : 22. 7. 1974



INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	1
Material und Methoden	9
Plasmodien- und Mäusestämme	9
Plaque-Technik	13
Ergebnisse	19
A. Parasitendichte, Hämatokrit und Milzfeuchtgewichte	19
B. Nachweis Plaque-bildender Milzzellen	22
Diskussion	30
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	44
Verwendete Medien	48
Tabellen	
Abbildungen	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543101_0006

EINLEITUNG

Neben Schüttelfrost und typischem Fieberverlauf ist die mit der Zerstörung der Erythrozyten durch die Malariaparasiten einhergehende schwere Anämie ein charakteristisches Symptom der Malaria-Infektion von Mensch und Tier (18). Schon bald nach der Entdeckung des Malaria-Erregers des Menschen wurde jedoch der Verdacht geäußert, daß die durch Malaria hervorgerufene Blutzerstörung über das direkt durch die Wirkung der Parasiten erklärbare Maß hinausgehe. Besonders im Verlauf des gefürchteten Schwarzwasserfiebers wurde vielfach eine Blutzerstörung beobachtet, die mit den geringen Parasitämiegraden nicht vereinbart werden konnte. CHRISTOPHERS und BENTLEY (4) fanden in Milzbiopsien von Schwarzwasserfieberkranken, daß neben parasitierten Erythrozyten auch zahlreiche nicht parasitierte Erythrozyten phagozytiert wurden. Weitere Untersuchungen von TALIAFERRO und MULLIGAN (24) sowie von MAEGRAITH (16) führten zu der allgemeinen Auffassung, daß zumindest die bei Schwarzwasserfieber auftretende Anämie nicht allein durch die Blutzerstörung in der Milz zufolge der bei dieser Verlaufsform meist niedrigen Parasitämie erklärt werden kann.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, hierfür im Tierexperiment den Nachweis zu führen. So folgte bereits TERZIAN (25) aus seinen Versuchen mit *Plasmodium lophurae*, einem Geflügelparasiten, daß es außer den Parasiten noch andere Faktoren geben müsse, die die Hämolyse unparasitierter Zellen bewirken. Auch MCGHEE (17) beobachtete, daß bei der Infektion von Enten mit *Plasmodium lophurae* trotz geringer Parasitendichte eine deutliche, durch Zerstörung der polychromatischen Erythroblasten hervorgerufene Anämie auftrat. JACOBS (13), der ebenfalls mit *Vogelmalaria* arbeitete, war jedoch nicht in der Lage, eine gegen Erythrozyten gerichtete Immunität in seinen Versuchstieren nachzuweisen.

Nach der Entdeckung der für Mäuse und Ratten pathogenen Plasmodienarten (*Plasmodium berghei*, *Plasmodium vinckei*) haben sich erneut zahlreiche Autoren mit der Frage beschäftigt, ob es im Zusammenhang mit einer Malaria-Infektion tatsächlich zu einer gegen körpereigene Erythrozyten gerichteten Immunreaktion kommen könne.

Eine zusammenfassende Übersicht über die bis 1964 vorliegende Literatur findet sich bei ZUCKERMAN (29); die seither erschienene Literatur wurde von BROWN (3) kritisch gewürdigt.

Unter Autoimmunität versteht ZUCKERMAN im strengen Sinne von BRENT und MEDAWAR (2) die Produktion von Antikörpern gegen einen nativen unveränderten Bestandteil des eigenen Körpers oder gegen fremdes Antigen, dessen Antikörper Kreuzreaktion mit einem nativen körpereigenem Antigen zeigt. Native Komponenten des Körpers, deren antigener Charakter durch ein Medikament oder ein infektiöses Agens verändert wurde und die daher gleichfalls die Produktion von Antikörpern anregen können, werden als "modified autoantigens" betrachtet. Gerade die Entstehung von "modified autoantigens" durch Medikamente kann bei der menschlichen Malaria nicht sicher ausgeschlossen werden, da fast alle bekannten Malariamittel durch Einwirkung auf den Stoffwechsel der Erythrozyten hämolytisch wirken können (19).

Folgende Möglichkeiten, die zum Erwerb einer hämolytischen Anämie infolge einer Infektionskrankheit führen könnten, werden diskutiert:

1. Der Infektionserreger hat ein oder mehrere Antigene mit der Wirtszelle gemeinsam, wie z.B. bei der Streptokokken-Glomerulonephritis.
2. Die betroffene Wirtszelle kann mit parasitärem Antigen beladen sein, an das dann antiparasitäre Antikörper gebunden werden, die zur Zellzerstörung führen.

3. Die Zelle wird durch den Parasiten oder seine Stoffwechselprodukte oder durch ein zur Behandlung verwendetes Medikament so verändert, daß sie autoantigen wird.

Alle Varianten sind im Zuge einer Malariaerkrankung denkbar und auch verschiedentlich postuliert worden. Der Haupteinwand bestand bisher darin, daß zirkulierendes Hämolysin nicht nachgewiesen werden konnte. Dies muss jedoch kein absoluter Gegenbeweis sein, als sich hierfür mehrere Erklärungen anbieten, u.a. daß die Gesamtmenge der gebildeten Antikörper an das Antigen, die Erythrozyten, gebunden und erst der nach Ab-sättigung dieser Zellen verbleibende Überschuss nachzuweisen ist. Auch bei erworbenen hämolytischen Anämien von unzweifelhaftem Autoimmuncharakter gelingt der Nachweis zirkulierenden Hämolysins nur unter den genannten Voraussetzungen (29).

Andere Möglichkeiten, die zu einer Anämie führen, wären Hypersplenismus, verbunden mit einer vermehrten Phagozytose, oder eine ebenfalls durch Milzvergrößerung bedingte reduzierte Erythropoese; ferner käme die bereits erwähnte durch Arzneimittel direkt induzierte Hämolyse in Frage, besonders bei der Verwendung von malariawirksamen 8-Amino-chinolinen bei Patienten mit Glucose-6-Phosphatdehydrogenasemangel (19).

Literatur und eigene Ergebnisse erlauben nach ZUCKERMAN (29) folgende Schlussfolgerungen im Zusammenhang mit den drei genannten Möglichkeiten, die zu einer erworbenen hämolytischen Anämie führen können:

1. Lösliches Plasmodium-Antigen wird auch von gesunden Erythrozyten absorbiert. Dies würde zu einer Sensibilisierung der Erythrozyten und zu ihrer erhöhten Phagozytose in der Milz führen. Der sichere Nachweis hierfür steht jedoch noch aus.
2. Plasmodien haben mit den Erythrozyten gemeinsame Antigene. Auch hier erlauben die bisher vorliegenden experimentellen Daten keine eindeutige Stellungnahme.
3. Es liegt eine echte Autoimmunreaktion vor. Hierfür spricht die Beobachtung, daß die Parasitämie zum Zeitpunkt des Einsetzens der Anämie oft gering ist, und daß die Anämie hauptsächlich zum Zeitpunkt oder erst nach der Krise exzessiv auftritt.

Unter der Voraussetzung, daß die beobachtete Anämie auf auto-hämolytische Vorgänge zurückgeführt werden könnte, wäre zunächst an eine lytische Zerstörung oder eine erhöhte Phagozytose sensibilisierter Erythrozyten zu denken. Beides ist belegt: erhöhte Phagozytose von nicht parasitierten Erythrozyten wird ohne Zweifel sowohl bei menschlicher als auch bei

Tiermalaria beobachtet; bei Schwarzwasserfieber wird die Hauptmasse der Erythrozyten vor allem intravasculär zerstört. Mit der erhöhten Phagozytose parasitierter und nicht parasitierter Erythrozyten geht die Vergrößerung der Milz einher, die bei chronischen Malaria-Infektionen als charakteristisches Symptom (Milz-Index) beobachtet wird (18). Eine Milzvergrößerung ist zugleich bei Erkrankungen, deren Autoimmuncharakter erwiesen ist, insbesondere Hämatopathien, ein häufig auftretendes Symptom (12). Die Beeinflussbarkeit der hämolytischen Erscheinungen bei Schwarzwasserfieber durch Corticoide (5) kann ebenfalls als Hinweis auf die immunologische Natur der Erythrozytendestruktion gewertet werden.

Gegen eine Hämolysen von Autoimmuncharakter spricht weniger, daß es bis heute nicht gelungen ist, zirkulierendes Hämolysin nachzuweisen, als vor allem, daß der Antiglobulin (=Coombs)-Test bei der Annahme einer Sensibilisierung der Erythrozyten zufolge der Malaria-Infektion positiv ausfallen sollte.

Hier liegen jedoch widersprüchliche Resultate selbst bei Schwarzwasserfieber vor (29). In Untersuchungen an malaria-infizierten Ratten (30) fiel der Coombs-Test regelmässig positiv aus. Spätere Nachprüfungen (31) an Ratten, die mit Phenylhydrazin behandelt oder durch wiederholte Blutentnahme

anämisch gemacht worden waren, ergaben jedoch, daß der positive Ausfall des Coombs-Test durch die stets vorhandene Retikulozytose bedingt war. Da die Malaria stets mit einer ausgeprägten Retikulozytose als unspezifischem Störfaktor verbunden ist, scheidet der Coombs-Test als Nachweismethode für zirkulierende oder sessile hämolytische Antikörper bei dieser Infektion aus.

Es lag daher nahe, die Frage, ob hämolytische Antikörper im Zuge einer Malaria-Infektion gebildet werden, mittels anderer geeigneter Methoden zu überprüfen. Dabei wurde eine erhöhte Spezifität und gesteigerte Empfindlichkeit gefordert. Hierzu bietet sich vor allem die von JERNE und NORDIN (14) entwickelte Plaque-Technik an. Der Vorteil dieser Methode liegt nicht nur darin, daß damit die erwähnten Fehlerquellen des Coombs-Test umgangen werden, sondern auch in der niedrigen Nachweisgrenze, die dadurch bedingt ist, daß die Antikörper am Ort der Entstehung, d.h. unmittelbar an der produzierenden Zelle selbst, nachgewiesen werden können.

Die Plaque-Technik ermöglicht in ihrer ursprünglichen Form eine Durchmusterung lymphatischer Organe auf ihren Gehalt an Hämolyisin-bildenden Zellen. Bei dieser Methode werden Tieren, die gegen heterologe Erythrozyten sensibilisiert wurden, Zellen

lymphatischer Organe entnommen und mit den Erythrozyten zusammengebracht, gegen die vorher sensibilisiert worden war. Unter Komplementvermittlung tritt dann eine Hämolyse ein. Diese ganze Reaktion vollzieht sich in einem agar. Die Hämolyse stellt sich als helle Zone rund um die sensibilisierte Zelle dar, als sogenannter Plaque; bei der Verwendung von Milzzellen werden damit Plaque-bildende Milzzellen (PMZ) nachgewiesen.

Die als "Direkte Technik" bezeichnete Originalmethode erlaubt nur die Erkennung IgM-Hämolysin-bildender Zellen, während sich die 7-S-Antikörper-bildenden Zellen wegen der fehlenden hämolysierenden Aktivität von IgG dem Nachweis entziehen. Allerdings konnten DRESSER und WALLIS (6) sowie SPERL und RIVA (22) im Jahre 1965 zeigen, daß sich auch 7-S-Antikörper-bildende Zellen unter Anwendung von Anti-IgG-Seren quantitativ erfassen lassen; deshalb bezeichnet man dieses Verfahren auch als "Indirekte Plaque-Technik". Dieses als sogenanntes "Entwickler-serum" wirkende Anti-IgG-Immunprotein ist bei der indirekten Technik erforderlich, da ein einzelnes IgM-Molekül zufolge seines pentameren Aufbaus Komplement aktiviert und zur Hämolyse führt, während hierzu ein monomeres IgG-Molekül nicht in der Lage ist. Dies wird erst durch die Bildung eines IgG-Anti-IgG-Komplexes erreicht. Eine morphologische Charakterisierung der als PMZ

erfassten Zellpopulationen ist nicht möglich, wohl aber eine funktionelle. Die gehören auf Grund der Fähigkeit zur Antikörperbildung der sogenannten B-Zellreihe an, deren charakteristische Population die Plasmazellen darstellen. Die zeitliche Verteilung der 7-S- und der 19-S-Globulin bildenden Zellen bestätigt dies.

Wir haben versucht, in Mäusen, die mit einer Reihe von Plasmodien-Stämmen unterschiedlicher Virulenz infiziert worden waren, hämolytische Antikörper produzierende Zellen mittels dieser Technik nachzuweisen. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird nachstehend berichtet.

MATERIAL UND METHODEN

Plasmodien und Mäuse-Stämme

Die heute in den verschiedenen Laboratorien auf Mäusen oder Ratten gehaltenen Stämme von *Plasmodium berghei* oder *Plasmodium vinckei* gehen auf Stämme zurück, die in den 50iger und 60iger Jahren aus verschiedenen *Thamnomys*arten oder aus *Anopheles durenii*, dem natürlichen Überträger der Nagetiermalaria, isoliert wurden (9). Die einzelnen Stämme unterscheiden sich in ihrer Virulenz für verschiedene Mäuse-Stämme. Die von uns verwendete NMRI-Maus zeichnet sich durch eine hohe natürliche Resistenz gegen *P. berghei* aus (15). Der uns aus

Tübingen zur Verfügung gestellte Stamm K 173 scheint jedoch im Zuge mehrfacher Eingefrierungen an Virulenz zugenommen zu haben, so daß der Infektion mit diesem Stamm, der nach früheren Berichten zu einer mehr chronischen Infektion geführt hatte, die Mäuse in wenigen Tagen erliegen. Das von uns für chemotherapeutische Untersuchungen verwendete P. vinckei ist für MRL-Mäuse hoch pathogen und führt in fünf bis sechs Tagen zum Tode der Versuchstiere (?).

Diese kurz und tödlich verlaufenden Infektionen, die erhebliche Anämiegrade in den befallenen Tieren hervorrufen, sind für die hier vorgesehene Fragestellung ungeeignet, da nicht damit gerechnet werden kann, daß sich innerhalb einer solchen kurzen Zeit Autoantikörper entwickeln können. Wir haben daher für diese Versuche resochin- und primaquinresistente Stämme von P. vinckei verwendet, die wir aus dem Originalstamm herausgezüchtet haben und die sich von diesem durch einen chronischen Infektionsverlauf unterscheiden, den die Tiere in der Regel überleben. Folgende Stämme fanden Verwendung:

VR: P. vinckei-Stamm, resistent gegen 50 mg/kg Resochin ip.,

VP: P. vinckei-Stamm, resistent gegen 30 mg/kg Primaquine ip.,

VRU: P. vinckei-Stamm, ursprünglich resistent gegen 50 mg/kg

Resochin ip., dann aber ohne Medikamentendruck über mehrere Passagen gehalten.

Die vor diese Kennbuchstaben gesetzten Ziffern geben jeweils die Nummer der zur Verwendung gekommenen Passage an. Alle genannten Stämme werden in unseren Laboratorien seit Jahren ausschliesslich durch Blutübertragung auf Mäusen bzw. tiefgekühlt in flüssigem Stickstoff gehalten. Alle Stämme sind bartonellenfrei.

Die verwendeten weiblichen Reinzuchtmäuse des Stammes NMRI/Orig. Kißlegg stammten aus den medizinischen Versuchstierzuchten S. IVANOS, Kißlegg/Allgäu. Sie wurden zu 6 bis 8 Stück in Makrolonkäfigen (Bodenfläche: ca. 400 cm²) gehalten. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn 6 bis 10 Wochen alt und wogen 18-22 Gramm. Die Mäuse erhielten als Standarddiät Altromin (R) der Firma Alltrogge, Laage/Lippe, und Wasser ad libitum. Sie wurden bei täglich 12 Stunden Tageslichtbeleuchtung mit Leuchtröhren, 55 bis 65 % relativer Luftfeuchtigkeit und 23 bis 25° Celsius Raumtemperatur konventionell gehalten.

Die Infektion der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Verabreichung einer Blut-Zitrat-Kochsalzlösung, die durch Ausbluten einer infizierten Maus gewonnen wurde. Auf die Bestimmung des Parasitengehalts des Inokulums wurde verzichtet, da die Untersuchungen erst im späteren Verlauf der Infektion unternommen wurden und zu diesem Zeitpunkt der Parasitämiegrad vom Inokulum nicht mehr abhängig war.

Die Parasitendichte wurde in nach Giemsa gefärbten Blutaussstrichen bestimmt. Die Auszählung der Blutaussstriche erfolgte bei 640-facher Gesamtvergrößerung. Hierbei umfasste ein Gesichtsfeld bei Beginn der Infektion etwa 750 Erythrozyten. Je nach Befall wurden 50, 10 oder nur ein Gesichtsfeld ausgezählt. Da mit zunehmender Parasitämiedauer der Erythrozytengehalt des Blutes abnimmt, geben die so ermittelten Parasitämiewerte nur im Anfangsstadium der Infektion ein zuverlässiges Bild für den prozentualen Befall der Erythrozyten. Bei einem Erythrozytengehalt des Mäuseblutes von ca. 8×10^6 Erythrozyten/mm³ entsprechen 10 gezählte parasitierte Erythrozyten (PE) am Anfang der Infektion einem Parasitämiegrad von 1,3% oder ca. 1.000 PE pro mm³. Diese grobe Schätzung der Parasitendichte ist hier ausreichend, da es bei der vorliegenden Fragestellung weniger auf die Parasitämiewerte ankommt, als vielmehr auf die mit dem Blutbefall einhergehende Erythrozytenzerstörung.

Der Hämatokrit wurde nach der DIN-Norm 58933 in Anlehnung an das Verfahren von SPURMIA, SAMPLE und HART (23) bestimmt. Das Blut hierfür wurde direkt mit dem Hämatokritröhrchen aus dem retroorbitalem Venenplexus der Maus entnommen.

Zur Bestimmung des Milzfeuchtgewichtes wurden die Tiere in Äther getötet und nach Öffnung des Bauchraumes die Milz entnommen. Unmittelbar anschliessend wurde die Milz nach Abtupfen

des Blutes gewogen. Milzen, die für Plaque-Technik weiter verwendet wurden, wurden anschliessend sofort in eisgekühlte Hankslösung überführt.

Das für die Plaque-Technik benötigte Blut wurde durch Ausbluten der mit Äther betäubten Tiere nach Entfernung des Auges aus dem retroorbitalen Venenplexus gewonnen. Um die Ausfällung etwaiger vorhandener Kälteagglutinine zu vermeiden, wurde das Blut unter Zusatz von Heparin sofort zentrifugiert und nach Entfernung des Plasmas mehrfach gewaschen.

Plaque-Technik

Die von JERNE und NORDIN (14) erstmals beschriebene Methode wurde geringfügig geändert.

1. Präparieren der Platten

a) Giessen der Unterschicht:

Verwendet wurden in allen Fällen sterile Petrischalen aus Polystyren von 87 mm Ø. Für die Unterschicht werden 7,5 ml einer 1,2%igen Agarose in Dulbeccos Medium benötigt.

(Zusammensetzung siehe Anhang). Bezeichnet man die Gesamtmenge der benötigten Unterschicht mit x, so beträgt die Gesamtmenge an agarose für das Gesamtvolumen der Unterschichten $0,012x$ g. Die berechnete Menge Agarose wird in $0,4x$ ml Aqua dest. unter

starkem Rühren eingebracht und durch Erhitzen gelöst. Nach vollständiger Lösung werden 0,5x ml kaltes Aqua dest. hinzugefügt. Nach Abkühlung auf ca. 60° C werden 0,08x ml konzentrierte PBS-A-Lösung, 0,01x ml PBS-B-Lösung und 0,01x ml PBS-C-Lösung dazugegeben. Nach guter Durchmischung werden mit einer vorgewärmten Pipette je 7,5 ml der Lösung in eine Petrischale einpipettiert. Um eine möglichst gleichmässige Dicke der Agaroseschicht zu erreichen, lässt man die Platten auf einem waagrecht ausgerichteten Tisch erstarren. Die Petrischalen mit der Agargrundschicht können sofort verwendet oder bis zu 24 Stunden im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt werden.

b) Giessen der Oberschicht:

Für die Oberschicht, in welche die Mäuseerythrozyten und die Milzzellen eingegossen werden, benötigt man pro Platte 2 ml einer 0,6%igen Agaroselösung in Gey's-Lösung. (Zusammensetzung siehe Anhang). Hierfür werden 6x mg Agarose (x = ml der benötigten Oberschicht) in 0,8x ml Aqua dest. aufgelöst. Nach Lösung der Agarose werden unter Erhitzen 0,1x ml konzentrierte Gey's-Lösung A, 0,05x ml Gey's-Lösung B und 0,05x ml Gey's-Lösung C zugefügt. Mit einer vorgewärmten Pipette werden jeweils 2 ml der klaren, leicht rot gefärbten Lösung in Reagenzgläser einpipettiert, die bis zur Aussaat in einem Wasserbad von genau

47° C gehalten werden. Auf eine exakte Einhaltung dieser Temperatur ist besonders zu achten, da es bei Absinken der Temperatur leicht zur Ausfällung von Agar kommen kann.

2. Gewinnung der Milzzellen (Plaque-bildende Milzzellen = PMZ)

Den in Frage kommenden Versuchstieren wurde die Milz wie oben beschrieben entnommen. Die herausgenommenen Milzen von 5 - 6 Tieren einer Versuchsgruppe wurden zunächst in Hankslösung bei 4° C aufbewahrt. Zur Gewinnung der Milzzellen wurden die Milzen zunächst mit der Schere zerkleinert und anschliessend nach Versuchsgruppen zusammengefasst mit einem Glasstab durch ein steriles Stahlsieb mit 60 Löchern pro cm² gepresst. Von den stark vergrösserten Milzen der kranken Tiere wurden nur Teile verwendet, die in der Grösse den Milzen der gesunden Kontrolltiere entsprachen. Das so gewonnene Zellmaterial wurde zunächst in kalter Hankslösung aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt, wo man die schwereren Partikel sedimentieren liess. Der Überstand wurde abpipettiert und 5 Minuten bei 1.000 U/min. in der Kühlzentrifuge geschleudert. Der nunmehr klare Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das milzzellhaltige Sediment mit 5 ml Hankslösung erneut aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, um alle Serumbestandteile des Trägartieres aus der Milzzellsuspension zu entfernen. Nach der letzten Aufschwemmung wurde der Zellgehalt des

Sediments durch Zählung in der Zählkammer bestimmt und anschliessend die Suspension durch Verdünnung mit Hankslösung auf eine Konzentration von 10^7 PMZ/ml gebracht.

2b) Herstellung der Erythrozytensuspension

Die nach der oben beschriebenen Methode gewonnenen Erythrozyten wurden mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Es wurden Erythrozyten von erkrankten und gesunden Tieren getrennt angesetzt. Anschliessend wurde die Erythrozytenkonzentration der Suspension nach bekanntem Zählverfahren bestimmt und durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung auf eine Konzentration von $4 \cdot 10^9$ Erythrozyten pro ml gebracht.

3. Aussaat der Zellen

In die Röhrchen, die 2 ml Oberschicht enthalten und sich im Wasserbad bei 47° C befinden, gibt man unter vorsichtigem Schwenken jeweils 0,1 ml der Erythrozyten- und 0,1 ml der Milzzellensuspension. Der Inhalt des Röhrchens wird auf die Agargrundschicht einer Platte gegossen und unter kreisförmiger Bewegung so in der Petrischale verteilt, daß eine homogene Schicht des Zell-Agar-Gemisches erreicht wird. Bis zur Erstarrung der Oberschicht lässt man die Petrischalen einige Minuten auf der waagerechten Tischplatte stehen.

4. Entwicklung der Plaques

a) Direkte Plaque-Technik, Nachweis "direkt Plaque-bildender Milzzellen" (DPMZ)

Nach Erhärtung der Oberschicht wurden die Platten für zwei Stunden im Brutschrank bei 37° C gehalten. Pro Versuchsgruppe wurden in der Regel 5 bis 8 Platten hergestellt. Auf jede Agarplatte wurden nach zweistündiger Bebrütung 2 ml 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Mehrschweinchenkomplement gegeben. Anschliessend wurden die so behandelten Platten für eine weitere Stunde bei 37° C inkubiert.

b) Indirekte Plaque-Technik, Nachweis "indirekt Plaque-bildender Milzzellen" (IPMZ)

Ebenso wie bei der direkten Technik wurden auch bei der indirekten 6 Platten pro Versuch gegossen. Nach anfänglich ein-stündiger Bebrütung bei 37° C wurden sie mit je 2 ml eines 0,5%igen inaktivierten und mit HE absorbierten Anti-Maus- γ -Globulin-Serum (Behring-Werke) als "Entwicklerserum" beschickt und für eine weitere Stunde im Brutschrank belassen. Anschliessend wurde das "Entwicklerserum" von den Platten abgegossen und den Platten jeweils 2 ml des 1 : 10 verdünnten Mehrschweinchen-serums wie bei der direkten Technik zugegeben. Danach wurde nochmals für eine Stunde bei 37° C bebrütet.

5. Auszählung der Plaques

Die Auszählung erfolgte bei beiden Methoden mit dem freien Auge, wobei die Platten gegen einen beleuchteten Untergrund gehalten wurden. In zweifelhaften Fällen wurde das entsprechende Plaque-Feld auch unter dem Auflichtmikroskop betrachtet. In ~~allen Fällen~~ wurde darauf geachtet, daß nur Plaques, die von einzelnen Zellen gebildet wurden, zur Auswertung gelangten. Insgesamt liess sich jedoch feststellen, daß Mäuseerythrozyten weniger gut als Hammelerythrozyten für diese Methode geeignet sind; vielfach kam es zu einer vorzeitigen Hämolyse in der Oberschicht, die die Kontraste verminderte und damit die Auszählung echter Plaques wesentlich erschwerte.

Für die statistische Auswertung der Befunde wurde nach dem Additionsverfahren zu jedem Mittelwert ($\bar{x}$) die Standardabweichung (S_d) berechnet. 'N' bedeutet die Anzahl der zu dem Versuch benutzten Tiere bzw. Platten. Die Wahrscheinlichkeit α , mit der sich unter der zu prüfenden Hypothese das Versuchsergebnis oder ein noch unwahrscheinlicheres zufällig ergeben würde, wurde nach dem Prüfverfahren von STUDENT (t)-Test durchgeführt.

ERGEBNISSE

A. Parasitendichte, Hämatokrit und Milzfeuchtgewichte während der Infektion

1. Parasitendichte

Die in Abbildung 1 dargestellten Parasitämiekurven für die Stämme VR, VP und VRU geben ein charakteristisches Bild des üblichen Infektionsverlaufs bis zum 21. Tag pi. bei der Infektion von NMRI-Mäusen mit diesen Stämmen. Nach einem relativ hohen Inokulum von ca. 1 Mio. parasitierten Erythrozyten (PE)/Maus kommt es bereits am 2. Tag pi. zu einer patenten Infektion. Die Parasitämiewerte erreichen rasch Werte um 40 - 60 PE/Gesichtsfeld und halten sich auf diesem Niveau bis etwa zum 8. Tag pi. Nach diesem Zeitpunkt kommt es zu einem erneuten Anstieg der Parasitendichte auf Werte über 200 PE/Gsf. Ab etwa 3 Wochen nach der Infektion wird die Parasitenentwicklung uneinheitlich. Bei einem Teil der Tiere kommt es zu einem vollständigen Verschwinden der Parasiten aus dem peripheren Blut. Dies ist jedoch nicht gleichbedeutend mit einer sterilen Heilung, sondern in unregelmässigen Abständen kann es noch nach mehr als 100 Tagen pi. verschiedentlich zu Rückfällen kommen. Ein Teil der Tiere fällt der Infektion nach dem 21. Tag - in einzelnen Fällen auch schon früher - zum Opfer. Die Zahl der Tiere, bei denen Parasiten im peripheren Blut noch nachweisbar sind im Verhältnis zur Zahl der ursprünglich infizierten

tiere, ist in Tabelle 1 über einen längeren Zeitraum hinweg angegeben. Die 3 Stämme unterscheiden sich im Infektionsverlauf nicht signifikant. Sie führen zu einer im Vergleich zur Infektion mit einem normalen Plasmodium vinckei-Stamm als chronisch zu bezeichnender Infektion. Damit sind die Voraussetzungen für die Bildung hämolytischer Autoantikörper gegeben.

2. Milzfeuchtgewichte

Die Milzfeuchtgewichte der nicht infizierten Kontrollgruppen lagen zwischen 0,117 und 0,168 Gramm. Die Änderung des Milzfeuchtgewichtes während der Infektion mit den verschiedenen Plasmodium vinckei-Stämmen ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Die Zunahme des Milzgewichtes auf annähernd das 10-fache des Normalwertes erfolgt in allen drei Stämmen relativ rasch innerhalb der ersten 14 Tage nach der Infektion. Nach dem 20. Tag pi. fällt das Milzgewicht bei Infektionen mit VR relativ schnell innerhalb weniger Tage auf Werte um 300 - 500 mg, während bei VRU-Infektionen die Milzgewichte zunächst noch bis zum 47. Tag pi. bei hohen Werten von ca. 1000 mg bleiben, um erst nach diesem Zeitpunkt auf die gleichen noch erhöhten Werte wie bei den anderen Infektionen abzufallen. Die mit 300 - 500 mg deutlich erhöhten Milzfeuchtgewichte wurden nur bei den Infektionen mit VR über den 60. Tag hinaus verfolgt. Hier blieben die Feuchtgewichte noch bis zum 94. Tag, in der am längsten verfolgten

Gruppe, in dem angegebenen Bereich (339 mg). Auf Grund des sonst gleichartigen Infektionsverlaufes darf angenommen werden, daß auch bei Infektionen mit VP und VRU erhöhte Milzgewichte bis über den 60. Tag hinaus bestehen bleiben, sofern die Parasitämie in einzelnen Tieren noch fort dauert, wenn sie auch mikroskopisch vielfach nicht mehr nachweisbar ist.

Die starke Streuung der Einzelwerte zwischen 20. und 30. Tag und um den 70. Tag pi., die sich in der grossen Standardabweichung der Mittelwerte ausdrückt, ist auf die hier beobachteten Maximalwerte der Milzvergrößerung zurückzuführen. Diese erreichten hier Werte von 1.863 g (21. Tag pi.), 1.753 g (27.), 1.520 (69.) und 1.380 g (73.). Andererseits kommt hier jedoch auch zum Ausdruck, daß das Infektionsgeschehen trotz der Verwendung von Reinzuchtmäusen einen individuell verschiedenen Verlauf nimmt.

Nach dem Bild des Milzgewichtsverlaufes könnte mit dem Auftreten von Zellen, die hämolytische Autoantikörper produzieren, vom 10. Tage pi. ab gerechnet werden. Da die Bildung derartiger Antikörper vor allem während des chronischen Stadiums der Infektion zu erwarten ist, dehnten sich unsere Untersuchungen von diesem Zeitpunkt an über die Gesamtdauer der Infektion aus.

3. Hämatokrit

Die in Abbildung 3 dargestellten Kurven der Hämatokritwerte zeigen das Ausmaß der Blutzerstörung infolge der Infektion mit den verschiedenen Stämmen. Da während des akuten Stadiums der Infektion nicht zwischen Blutzerstörung durch Parasiten und durch die Einwirkung autohämolytischer Antikörper unterschieden werden kann, haben wir den Hämatokrit nur in einem Versuch mit VRU vom 4. - 21. Tag pi. genauer bestimmt (Abb. 4). Die Kurven der Hämatokrite und der Milzfeuchtgewichte verhalten sich annähernd spiegelbildlich. Während der ersten 14 Tage pi. fällt der Hämatokrit rasch auf Werte um 30, bei den Infektionen mit VRU sogar auf Werte um 20, die hier bis zum 40. Tag pi. persistieren, um dann bis zum 50. Tag pi. allmählich normale Werte zu erreichen. Bei Infektionen mit VF und Va ist das Ausmaß der Blutzerstörung nicht so groß; hier werden die Normalwerte bereits bis zum 40. Tag pi. wieder erreicht. Wie schon bei der Milzvergrößerung schlägt sich auch in der Hämatokritkurve der schwerere Verlauf der unbehandelten VRU-Infektion nieder. Die Rückkehr zu normalen Hämatokritwerten fällt zeitlich mit der Abschwellung der Milz zusammen.

B. Nachweis Plaque-bildender Milzzellen (PMZ)

Bei der Präparation und Homogenisierung der kranken Milzen, die ja in der Regel erheblich vergrößert waren, zeigte sich, daß

sie wesentlich schwerer durch das feine Metallsieb zu pressen waren, als die von Kontrolltieren gewonnenen Milzen. Ferner war festzustellen, daß sich Mäuseerythrozyten wesentlich weniger für die Plaque-Technik eigneten als Hammelerythrozyten. Die bei Mäuseerythrozyten leicht eintretende spontane Hämolyse erschwerte das Ablesen der Platten oft erheblich. Es war daher nicht in allen Versuchen möglich, die Plaques aller Platten einwandfrei abzulesen. In die nachstehend beschriebenen Ergebnisse wurden daher nur jene Versuche aufgenommen, bei denen eine einwandfreie Auswertung der Platten möglich war.

1. Infektion mit VF-Stamm

Mit diesem primaquinresistenten Plasmodium vinckei Stamm wurden insgesamt 2 Versuche zum Nachweis von PMZ durchgeführt.

Versuch 1

Im ersten Versuch wurden je 5 Tieren, die 51 Tage vorher infiziert worden waren, die Milzen entnommen und für die Gewinnung von Zellen weiterverarbeitet. Zur Aussaat auf den Kontrollplatten wurden Milzzellen von 5 gesunden Tieren verwendet. Von beiden Gruppen wurden je 20 Platten angefertigt, von denen jeweils die Hälfte mit Erythrozyten aus den gesunden bzw. aus den kranken Tieren überschichtet und davon wiederum die Hälfte nach der direkten bzw. indirekten Technik behandelt wurde.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen war sowohl die Zahl der DPMZ als auch die der IPMZ signifikant um das 22-fache bzw. 10-fache gegenüber den Zellen aus Kontrolltieren erhöht. Bei Überschichtung mit Erythrozyten aus gesunden Tieren war gleichfalls eine Erhöhung der PMZ-Werte zu beobachten, die jedoch geringer ausfiel.

Versuch 2

In diesem Versuch wurden die Milzen von je 5 Tieren, die 13, 25, 32, 40 und 52 Tage vorher infiziert worden waren, verarbeitet und zusammen mit den aus diesen Tieren gewonnenen Erythrozyten ausgesät. Gleichzeitig wurden die Milzzellen von 5 Kontrolltieren auf Kontrollplatten ausgesät. Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 3 hervorgeht, war nur in der vor 13 Tagen infizierten Gruppe eine Erhöhung der DPMZ zu beobachten. Die Zahl der IPMZ war in dieser Gruppe deutlich vermindert. Bei den übrigen Gruppen war eine signifikante Veränderung der DPMZ und IPMZ nicht zu beobachten.

2. Infektion mit VR-Stamm

Mit diesem roachinresistenten Plasmodium vinckei Stamm wurden insgesamt 4 Versuche durchgeführt.

Versuch 1

Im ersten Versuch wurden wie bei VP-Versuch 1 Milzen von 5 kranken und 5 gesunden Tieren aufgearbeitet und jeweils 20

Platten angefertigt, die zur Hälfte mit Erythrozyten aus kranken bzw. gesunden Tieren beschichtet wurden. Die kranken Tiere waren 26 Tage vorher infiziert worden. Wie aus den in Tabelle 4 aufgezeichneten Ergebnissen hervorgeht, war in allen Fällen eine signifikante Erhöhung sowohl der DPMZ als auch der IPMZ bei den kranken Tieren zu beobachten. Die um das 6-fache erhöhte Zahl der DPMZ war etwa doppelt so hoch wie die der IPMZ, sowohl bei der Verwendung von Erythrozyten aus gesunden wie auch bei der von kranken Tieren.

Bei den Versuchen 2, 3 und 4 wurden jeweils 5 Mäuse, die zu verschiedenen Zeiten vorher infiziert worden waren, zusammengefasst und die Milzen für die Gewinnung von PMZ verarbeitet.

Versuch 2

Hier kamen Milzen zur Verwendung von Tieren, die 12, 19 und 32 Tage vorher infiziert worden waren. Parallel dazu wurden die Milzen von 5 nichtinfizierten Tieren verarbeitet. Von jeder Gruppe wurden jeweils 10 Platten angefertigt, die mit den vereinigten Erythrozyten aus den kranken Tieren überschichtet wurden. Die in Tabelle 5 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen nur in der Gruppe, die 32 Tage vorher infiziert worden war, eine mehr als 5-fache Erhöhung der DPMZ und IPMZ gegenüber den gesunden Tieren. Die 12 Tage vorher infizierte Gruppe zeigte eine deutliche Erniedrigung der DPMZ gegenüber den Kontrollen.

Versuch 3

Bei diesem Versuch wurde wie bei Versuch 2 verfahren. Es wurden Zellen aus Milzen von je 5 Mäusen ausgesät, die 15, 27, 34, 38 und 55 Tage vorher infiziert worden waren. Parallel dazu wurden 10 Kontrollplatten mit Milzzellen von 5 Kontrolltieren beschichtet. Am Ende der Bebrütung waren jedoch die 5 Platten zum Nachweis von IPMZ bei den Kontrollen nicht auswertbar. Für die Beurteilung des Versuchsergebnisses (Tabelle 6) kann jedoch die Gruppe, die 55 Tage vorher infiziert worden war, als Kontrollgruppe gewertet werden. Unter der Annahme einer etwa doppelt so hohen Zahl an IPMZ würde deren Zahl dann etwa 20 betragen. In diesem Versuch zeigten nur die Milzen aus Tieren, die 15 und 27 Tage vorher infiziert worden waren, eine deutliche Zunahme an DPMZ und IPMZ um etwa das 3- bis 7-fache gegenüber den Kontrolltieren, bzw. der Gruppe, die 55 Tage vorher infiziert worden war. Bei den 34 und 38 Tage vorher infizierten Tieren war eine leichte Depression der IPMZ festzustellen.

Versuch 4

Dieser Versuch wurde in gleicher Weise wie Versuch 3 durchgeführt mit dem Unterschied, daß hier die Milzzellen von Tieren, deren Infektion schon länger bestand (66 bis 94 Tage) verwendet wurden. Im Vergleich zu den gleichzeitig verarbeiteten

Milzzellen nicht-infizierter Kontrolltiere war nur bei den 80 Tage vorher infizierten Tieren eine signifikante Erhöhung der DPMZ und IPMZ um das 2,7 bzw. 6,1-fache zu beobachten. Die übrigen Gruppen zeigten geringgradige Erhöhungen um das 1,5 bis 3-fache bzw. annähernd die gleichen Werte wie die Kontrollgruppe (Tabelle 7) .

3. Infektion mit VRU-Stamm

Mit diesem Plasmodium vinckei Stamm wurden insgesamt 3 Versuche unternommen. Die beiden ersten Versuche glichen im wesentlichen den bisher mit den anderen Stämmen unternommenen Versuchen. Im ersten Versuch wurden Tieren, die 15 Tage vorher infiziert worden waren, und parallel dazu 5 Kontrolltieren Milz und Blut entnommen und der Oberschicht von jeweils 20 Platten zusammen mit den Milzzellen zur Hälfte Erythrozyten aus den infizierten Tieren und Erythrozyten aus den gesunden Kontrolltieren zugesetzt. Im zweiten Versuch wurden Tieren, die zu verschiedenen Zeiten vorher infiziert worden waren, die Milzen entnommen und wie in den Versuchen VR 3 und 4 weiterbehandelt. Im dritten Versuch wurde ein anderer Weg beschritten: hier wurden insgesamt 40 Mäuse am gleichen Tag infiziert; zu verschiedenen Zeitabständen wurden dann jeweils Gruppen von 5 Tieren Milz und Blut entnommen. Parallel dazu wurden gleichaltrige Kontrolltiere

gehalten und ebenfalls in Gruppen von 5 Tieren für die Gewinnung von Milzzellen und Blut getötet.

Versuch 1

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 8 dargestellt. In allen Fällen, d.h. sowohl mit direkter wie indirekter Technik, war die Zahl der PMZ in den Platten mit Milzzellen aus kranken Tieren deutlich erhöht. Diese Erhöhung betrug sowohl bei DPMZ als auch bei IPMZ etwa das 5-fache der Kontrollwerte.

Im Gegensatz zu den Befunden bei Infektionen mit VP und VR war die Zahl der Plaques bei der Verwendung von Erythrozyten aus gesunden Tieren deutlich erhöht. Die Zahl der Plaques betrug hier bei DPMZ und IPMZ kranker Tiere etwa das Doppelte, bei den PMZ aus gesunden Tieren jedoch fast das 5-fache der Plaques, die bei Verwendung von Erythrozyten aus kranken Tieren auftraten.

Versuch 2

Bei diesem Versuch wurden die Milzzellen von Tieren, die 19, 26, 36, 47 und 56 Tage vorher infiziert worden waren, zusammen mit den Erythrozyten aus diesen kranken Tieren ausgesät. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist, waren die DPMZ nur bei den Tieren, die 19 Tage vorher infiziert worden waren, deutlich erhöht. Eine Erhöhung findet sich noch 36 Tage pi., doch ist diese nicht mehr signifikant. Bei den Platten zum Nachweis von IPMZ

traten in den Versuchsgruppen 26 und 36 sowie 47 Tage pi. überhaupt keine Plaques auf. Eine nicht signifikante Erhöhung der IPMZ fand sich wieder in der Gruppe 19 Tage pi. Insgesamt war die Zahl der Plaque-bildenden Zellen in diesem Versuch sehr gering.

Versuch 3

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um den zeitlichen Verlauf des Auftretens autohämolytischer Antikörper während der frühen Infektionsphase zu verfolgen. 40 Tiere wurden gleichzeitig infiziert. Vom 10. Tag pi. ab wurden in Abständen von 2 bis 3 Tagen Gruppen von je 5 Tieren getötet und ihre Milzzellen ausgesät. Parallel dazu wurden mit den Milzzellen gleichaltriger Kontrolltiere Kontrollplatten beschickt.

In Tabelle 10 sind zunächst die Ergebnisse der Versuche zum Nachweis von DPMZ dargestellt. Es zeigte sich eine deutliche Verminderung der DPMZ gegenüber den Kontrollen am 12. und 21. Tag pi. Eine Erhöhung der DPMZ trat bei den kranken Tieren am 14. und 19. Tag pi. auf. Die IPMZ (Tabelle 11) waren deutlich erhöht am 10., 12., 14. und 17. Tag pi.; die Platten, die dem

- - -

Nachweis am 19. Tag pi. dienen sollten, waren leider nicht auswertbar. Eine Verminderung der IPMZ trat auch hier am 21. Tag pi. auf.

DISKUSSION

Im Gegensatz zu der Infektion mit normalen *P. vinckei*-Stämmen, die in NMRI-Mäusen in wenigen Tagen zum Tode führt, kommt es bei der Infektion mit den resochoin- bzw. primaquinresistenten Stämmen VR, VP und dem ohne Arzneimitteldruck gehaltenen resochoinresistenten Stamm VRU zur Entwicklung eines chronischen Krankheitsbildes. Dieses Bild ist gekennzeichnet durch eine rasch einsetzende Vergrößerung der Milz, deren Feuchtgewicht innerhalb von 10 Tagen von Normalwerten um 400 mg auf Werte von über 1200 mg ansteigt. Diese erhöhten Milzgewichte persistieren bei den Infektionen VP und VR bis etwa zum 30. Tag pi., um dann rasch auf Werte um 200-500 mg abzusinken. Bei der etwas schwerer verlaufenden Infektion mit VRU pendeln die Milzfeuchtgewichte nach dem 20. Tag pi. um Werte zwischen 800 und 1000 mg, um erst nach dem 50. Tag auf ähnliche Werte wie bei den beiden anderen Infektionen abzufallen. In Einzelfällen waren im peripheren Blut Parasiten mikroskopisch auch über den 100. Tag hinaus nachzuweisen und die bis zum 100. Tag pi. noch festgestellten erhöhten Milzfeuchtgewichte sprechen bei manchen Tieren für das

Fortbestehen einer latenten Infektion über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Im gleichen Ausmaß wie das Milzfeuchtgewicht ansteigt, ist eine Abnahme der Erythrozyten zu beobachten. Die von uns gemessenen Hämatokritwerte sanken rasch innerhalb der ersten 10 Tage der Infektion mit VP und VR auf Werte um 30, bei Infektionen mit VRU auf Werte um 20, um in den nächsten 14 Tagen den Normalwert wieder zu erreichen. Bei der Infektion mit VRU war das Wiedererreichen des Normalwertes im Vergleich zu den übrigen Stämmen um ca. 14 Tage verzögert.

Der beschriebene Krankheitsverlauf liess die Bildung hämolytischer Antikörper in einem Zeitraum zwischen 10. und 50. Tag p.i. erwarten. Mit der direkten und indirekten Plaque-Technik gelang es, während dieses Zeitraumes Plaque-bildende Milzzellen nachzuweisen. Bei Auftragen der signifikant erhöhten Plaque-Werte gegen die Infektionszeit ergibt sich das in Abbildung 5 dargestellte Bild, das zunächst keine Aussage über den Verlauf der Ausbildung von autohämolytische Antikörper produzierenden Zellen zulässt. Dies rührt daher, daß die absolute Zahl an Plaque-bildenden Zellen auch bei strenger Beachtung der Vorschriften in den Kontrollplatten von Versuch zu Versuch bis zum 5-fachen variierte, was aber bei der absoluten geringen Zahl für die Aussage unerheblich erscheint. Um die Ergebnisse

der zu verschiedenen Zeitpunkten und mit den verschiedenen Stämmen durchgeführten Versuche miteinander vergleichen zu können, haben wir die Zahl der PMZ bei kranken Tieren durch die Zahl der PMZ bei den Kontrollen dividiert und die so ermittelten Quotienten gegen die Zeit aufgetragen. In diese Darstellung wurden nicht nur die signifikant erhöhten, sondern alle Werte, auch die erniedrigten, einbezogen. Dadurch ergab sich eine charakteristische Kurve (Abb. 6), die folgende Schlussfolgerungen zulässt:

Bei allen Infektionen ist zunächst bis etwa zum 15. Tag keine deutliche Erhöhung an PMZ in den kranken Tieren zu beobachten. Anschliessend kommt es zu einem starken Anstieg der PMZ bis zum 6- bis 7-fachen der bei den Kontrolltieren beobachteten Werte mit einem Maximum zwischen dem 16. und 18. Tag pi. In den folgenden Tagen fällt die Zahl an PMZ in den kranken Tieren ab, teilweise bis zu Werten unterhalb der bei den Kontrollen. Nach dem 25. Tag pi. bis etwa zum 32. Tag pi. ist ein erneuter Anstieg an PMZ in den kranken Tieren zu beobachten. In diesem Zeitraum wurden Versuche jedoch nur mit den Stämmen VR und VP durchgeführt. Es kann jedoch angenommen werden, daß ein ähnlicher zweiter Anstieg auch bei Infektion mit VRU auftritt. Nach dem 35. Tag pi. ist eine signifikante Erhöhung der PMZ-Werte nur noch in Einzelfällen zu beobachten; es ist damit zu

rechnen, daß diese Zellen in der vergrößerten Milz über den restlichen Infektionszeitraum persistieren.

Wenn wir die PMZ-Kurve der Abbildung 6 mit der Hämatokritkurve (Abb. 3) vergleichen, so wird deutlich, daß das Maximum der PMZ-Bildung mit dem stärksten Abfall der Hämatokrit-Werte zusammenfällt. Die beobachtete Blutzerstörung ist jedoch in diesem Fall in erster Linie durch die Parasiten bedingt. Während des zweiten Anstiegs der PMZ im Zeitraum zwischen 25 und 32 Tagen bestehen signifikant erniedrigte Hämatokritwerte nur noch bei Infektion mit VRU. Offensichtlich ist die Zahl der PMZ nicht ausreichend, um eine meßbare Anämie hervorzurufen. Dies schliesst nicht aus, daß bei anderen Malaria-Infektionen, etwa der menschlichen unter den besonderen Bedingungen des Schwarzwasserfiebers, derartige Zellen in weitaus grösserer Zahl auftreten können.

Bei Vergleich der PMZ-Kurven mit den Kurven der Milzfeuchtgewichte ist festzustellen, daß auch hier der erste Gipfel der PMZ-Bildung mit dem Maximum der Milzgewichtszunahme übereinstimmt. Die Abnahme des Milzgewichtes hinkt zeitlich dem Abfall der PMZ hinterher. Diese Übereinstimmung ist bei dem zweiten Gipfel der PMZ-Zunahme nicht mehr zu beobachten. Die Doppelgipfeligkeit der PMZ-Kurve könnte unter Berücksichtigung

der Tatsache, daß bei allen Versuchen gleich viele Milzzellen zur Aussaat kamen, in Verbindung mit der Änderung des Milzgewichtes dahingehend erklärt werden, daß zunächst bei der mit der Milzvergrößerung einhergehenden Zellvermehrung überproportional mehr PMZ gebildet werden. Im weiteren Verlauf der Infektion wird dann offensichtlich der Anteil dieser Zellen reduziert bzw. ihre Produktion von der der übrigen Zellen übertroffen. Die nach dem 25. Tag beobachtete Zunahme der PMZ könnte eine erneute Stimulierung der PMZ-Bildung bedeuten oder aber auch dadurch vorgetäuscht sein, daß bei der Abnahme der Milzvergrößerung die PMZ länger als die übrigen Zellen persistieren oder weitergebildet werden und erst später zugrunde gehen.

Eine andere Erklärung wäre, daß PMZ episodisch während des gesamten Infektionsverlaufes auftreten, und daß es bei der von uns gewählten Versuchsanordnung nicht mehr gelungen ist, nach dem 40. Tag einen solchen zufällig auftretenden Anstieg zu erfassen. Dies gilt auch für unsere Versuche mit VP, wo der sicher zu erwartende erste Gipfel der PMZ-Bildung durch die Durchführung der Versuche am 12. und 24. Tag pi. nicht erfasst werden konnte. Daß mit einem derartigen episodenhaften Auftreten von PMZ auch zu späteren Zeitpunkten noch gerechnet werden muss, wird durch die Beobachtung des Versuches 4 mit VR belegt, wo am 80. Tag pi.

eine deutliche Zunahme der PMZ zu beobachten war. Ferner ist zu bedenken, daß nach dem 30. Tag pi. ein Teil der Tiere sicher ausgeheilt war, ihre Milzen aber noch mitverwendet wurden und damit zu einer "Verdünnung" der PMZ der noch kranken Tiere führten.

Das episodische Auftreten wie auch die zu Beginn der Infektion (12. Tag pi.) beobachtete Verminderung der PMZ in den kranken Tieren und der wiederholte Abfall der PMZ unter die Kontrollwerte im weiteren Verlauf der Infektion könnte auch mit einer durch die Malariainfektion bedingten Immunsuppression erklärt werden, die die Bildung hämolytischer Antikörper zeitweise unterdrückt.

Die suppressive Wirkung einer Malariainfektion auf die Immunantwort gegen andersartige Antigene wird schon seit längerem im Zusammenhang mit dem beobachteten geringeren Erfolg von Impfungen gegen Tetanus und dem verminderten Auftreten von Autoimmunerkrankungen in den Tropen diskutiert (36). Experimentell gelang der Nachweis mit bestimmten Mäusestämmen, bei denen das spontane Auftreten von Krankheiten, die man für Autoimmunerkrankungen hält, durch Infektion mit Plasmodien verzögert werden konnte (10).

Wie eingangs erwähnt, ist bisher bei natürlichen und experimentellen Malariainfektionen der direkte Nachweis von Hämolsin, insbesondere hämolytischen Antikörpern, im peripheren Blut nicht gelungen. Unsere Ergebnisse beweisen, daß derartige Antikörper im Verlaufe einer chronischen Malariainfektion gebildet werden. Die absolute Menge der auch bei gesunden Tieren stets in geringer Zahl vorhandenen, hämolytische Antikörper bildenden Zellen ist jedoch gering. In Anbetracht der Tatsache, daß im Laufe einer Malariainfektion auch eine grosse Zahl von gesunden Erythrozyten phagozytiert wird, wäre es mit dem Überleben des Versuchstieres ohnehin nicht vereinbar, wenn die Zahl der PMZ wesentlich über die von uns beobachtete Menge hinausginge.

Das Ausmaß der durch die von uns nachgewiesenen PMZ hervorgerufene Hämolyse in vivo war sicher geringfügig und trat klinisch nicht in Erscheinung bzw. wurde während der ersten Phase von der durch die Parasiten bedingten Anämie völlig überdeckt. Wie wir gesehen haben, normalisierten sich selbst unter der Anwesenheit derartiger Antikörper bildenden Zellen die erniedrigten Hämatokritwerte und während der zweiten Zunahme an PMZ war eine signifikante Erniedrigung des Hämatokrits nicht zu beobachten. Inwieweit diese Aussage auch für Infektionen mit anderen Plasmodienarten Gültigkeit hat, kann hier nicht entschieden werden.

Allgemein ist jedoch festzustellen, daß die Menge der zirkulierenden Antikörper äußerst gering sein muss, worauf auch der vielfach negative Ausfall der Coombs-Teste hindeutet (29). Es stellt sich die Frage, ob in vivo die Menge der abgegebenen Antikörper zu einer wesentlichen hämolytischen Wirkung überhaupt beitragen kann. Es ist denkbar, daß die Wirkung derartiger Antikörper sich nur in der Milz entfaltet, wo der Sequestrationsmechanismus auch dann noch abläuft, wenn eine zytotoxische, durch Komplement verursachte Wirkung nicht mehr nachweisbar ist. In diesem Falle würden Erythrozyten durch die Antikörper nur soweit verändert, daß sie nicht der Hämolyse, sondern allein der Phagozytose zum Opfer fallen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß Parasiten aus Erythrozyten "ausgekämmt" werden, wenn sie die schmalen Milzgewebsspalten passieren (21). Es ist denkbar, daß nur derartige durch den Parasiten vorgeschädigte, morphologisch normal erscheinende Erythrozyten leichter einer Hämolyse durch hämolytische Antikörper zum Opfer fallen. Vorschädigung von Erythrozyten durch Parasiten wie auch durch hämolsierende Antikörper könnte auch die Ursache dafür sein, daß bei der Verwendung von Erythrozyten aus kranken Tieren öfters eine ausgedehnte allgemeine Hämolyse in den Platten zu beobachten war.

In diesem Zusammenhang sei auch auf die von WOODRUFF (28) vorgetragene Theorie des "big spleen disease" hingewiesen, worunter die im Gefolge zahlreicher parasitärer Erkrankungen in den Tropen auftretende Splenomegalie mit der gleichzeitig beobachteten Anämie in Verbindung gebracht wird. WOODRUFF sieht in einer bevorzugten Zerstörung der Erythrozyten durch hämolytischer Vorgänge die Ursache für diese Erscheinung. Der direkte Nachweis derartiger IgM- oder IgG-Antikörper ist jedoch auch dieser Arbeitsgruppe nicht gelungen; es konnten aber Leukoagglutinine nachweisen, die indirekt für die Besetzung von Erythrozyten mit derartigen Antikörpern sprechen. In die gleiche Richtung deuten Befunde von ROSENBERG und Mitarbeitern (20), die im Laufe einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* zunehmende Konzentrationen von IgM und abnehmende Konzentrationen von Komplement (C3) im Serum beobachteten. Der Nachweis von IgM auf den Erythrozyten gelang mit indirekter Immunofluoreszenz. Im Laufe der Infektion wurde ein Anstieg an IgM von 100 auf etwa 400 mg/l bis zum 22. Tag nach dem Einsetzen klinischer Symptome beobachtet. Die Erhöhung des IgM stimmt in der Größenordnung und im zeitlichen Auftreten mit der von uns beobachteten Vermehrung an direkten PMZ überein. IgA, IgG, IgE und IgD-Antikörper veränderten sich während des Beobachtungszeitraumes nicht.

Erhöhter Abbau normaler Erythrozyten wurde mit ^{51}Cr -markierten Erythrozyten nachgewiesen; aber sowohl der direkte als auch der indirekte Coombs-Test fielen bei allen Patienten negativ aus. Die Vermutung von ROSENBERG und Mitarbeitern, daß es sich möglicherweise nicht um Agglutinine handele und daß Coombs-Antisera besser für den Nachweis von IgG- als von IgM-Antikörpern geeignet seien, kann jedoch diese Diskrepanz nicht ausreichend erklären.

Offen bleibt die Frage nach der auslösenden Ursache für die Bildung von anti-erythrozytären Antikörpern. Die verschiedenen Möglichkeiten für ihre Entstehung wurden in der Einleitung diskutiert. WELLS (27) vermutet, daß sich die gegen die Parasiten gerichteten IgG-Antikörper auch an nichtparasitierte Erythrozyten anhängen und daß dies dazu führt, daß sowohl Erythrozyt wie IgG-Molekül verändert werden. Dies würde eine Haptenisierung mit einer Immunreaktion auch gegen die Trägersubstanz - bei einer Anlagerung parasitärer Faktoren an die Erythrozytenmembran gegen Oberflächenstrukturen - voraussetzen. Während die veränderten Erythrozyten die Produktion von IgM-Haemagglutininen auslösen, könnte das veränderte IgG-Molekül dann die Produktion von IgM-rheumatoiden Faktoren stimulieren.

GREENWOOD und Mitarbeiter haben einen ähnlichen Mechanismus postuliert, um die weite Verbreitung des Rheumatoidfaktors im

Serum von Nigerianern zu erklären (11). Eine andere Möglichkeit wäre von der Hypothese abzuleiten, die ALLISON und Mitarbeiter aufgestellt haben (1). Die Malaria-Infektion würde nach diesen Autoren zur Sensibilisierung von T-Lymphozyten führen und über einen carrier-Effekt, bei dem Malariaantigene mit Wirtsantigenen Komplexe bilden, würde diese T-Lymphozyten-Sensibilisierung im Sinne einer Helferfunktion zur Stillsetzung von B-Lymphozyten führen, die Autoantikörper gegen die Wirtserythrozyten und Immunglobuline produzieren würden. Analog der physiologischen Immunreaktion würden diese Antikörper zunächst der IgM-Klasse angehören, später würde durch die anlaufende IgG-Produktion dieser Prozess über eine Art Rückkopplung zum Stillstand kommen. Weiterhin könnten auch T-Zellen durch Rückkopplung daran gehindert werden, die Bildung von Antikörpern dauernd zu stimulieren. Derzeit liegen keine experimentell gewonnenen Ergebnisse vor, die zur Klärung dieser Frage beitragen könnten. Im Vordergrund steht unverändert die Schwierigkeit, Antikörper gegen Erythrozyten in malarieinfizierten Tieren nachzuweisen.

Für die Anwesenheit solcher Antikörper gab es bisher nur Hinweise, wie erhöhte Erythrozytenzerstörung oder Beladung von Erythrozyten mit Antikörpern, deren Spezifität und damit hämolytische Eigenschaft jedoch fraglich sind. Mit den hier

vorgelegten Ergebnissen ist der geforderte direkte Nachweis der Existenz hämolytischer, gegen die körpereigenen Erythrozyten gerichteter Antikörper in malariainfizierten Versuchstieren gelungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Anwendung der JERNE-schen Plaque-Technik gelang es, hämolytische Antikörper produzierende Milzzellen (PMZ) in NMRI-Mäusen, die mit verschiedenen Stämmen von Plasmodium vinckei infiziert worden waren, nachzuweisen. Während Plasmodium vinckei in NMRI-Mäusen eine innerhalb weniger Tage tödlich verlaufende Infektion bewirkt, wurden von den verwendeten resochin- und primaquinresistenten Stämmen chronische, bis zu 80 Tage persistierende Infektionen hervorgerufen, die die meisten Versuchstiere überlebten. Im Zuge dieser Infektionen trat eine ausgeprägte Splenomegalie auf mit einer Zunahme des Milzfeuchtgewichtes von durchschnittlich 150 mg auf über 1000 mg. Die Vergrößerung der Milz erfolgte rasch innerhalb weniger Tage nach der Infektion der Tiere; das Maximum wurde innerhalb der ersten 14 Tage pi. erreicht. Nach 25 Tagen pi. sank das Milzgewicht auf erhöhte Werte von 300 - 500 mg. Parallel mit der Vergrößerung der Milz war während der akuten Phase der Infektion eine Abnahme des Hämatokrits auf Werte um 20 - 30 zu beobachten. Diese Werte normalisierten sich bis zum 30. - 50. Tag pi. während der chronischen Phase der Infektion.

Die FMZ zeigten eine Zunahme mit Häufigkeitsmaximum zwischen 12. und 13. Tag pi. und ein zweites Maximum zwischen 25. und 26. Tag pi. Die Häufigkeitsmaxima deckten sich mit den Phasen der Milzvergrößerung und der Milzreduktion. Die Zahl an DFMZ und IPMZ unterschied sich nicht wesentlich, so daß die Hauptmenge der gebildeten hämolytischen Antikörper der IgM-Klasse zugeordnet werden kann. Damit ist der erste direkte Nachweis von hämolytischen Antikörpern im Gefolge einer Malariainfektion gelungen.

LITERATUR

- (1) ALLISON, A.C., DENMAN, A.M. and BARNES, R.D.
Cooperating and controlling functions of thymus-derived lymphocytes in relation to autoimmunity.
Lancet, 2, 135-140 (1971)

- (2) BRENT, L. and MEDAWAR, P.B.
Tolerance and autoimmune phenomena. In: G. Tenevall, ed.
Recent Progress in Microbiology, Thomas, Springfield,
Illinois, pp. 181-190 (1959)

- (3) BROWN, I.N.
Immunological aspects of malaria infections.
Adv. Immunol., 11, 267-349 (1969)

- (4) CHRISTOPHERS, S.R. and BENTLEY, C.
Phagocytosis of red cells in blackwater fever.
J. Am. Med. Assoc. 50, 1383 (1908)

- (5) DEMIRAG, B. and SÖZER, C.
Hemolytic anemia following malaria.
Ann. Paediat. 186, 86-89 (1956)

- (6) DRESSER, D.W. and WORTIS, H.H.
Use of an antiglobulin serum to detect cells producing
antibody with low haemolytic efficiency.
Nature 208, 859 (1965)

- (7) FINK, E.
Standardisierung der Plasmodium vinckei Infektion in
NMRI-Mäusen.
Z. Tropenmed. Parasitol. 20, 420-429 (1969)

- (8) FULTON, J.D. and MAEGRAITH, B.G.
The physiologic pathology of malaria. In: F. Boyd, ed.
Malariariology,
W.B. Saunders Company, Philadelphia and London 1949,
pp. 904-934

- (9) GARNHAM, P.C.C.
Malaria parasites and other haemosporidia.
Blackwell Scientific Publications, Oxford 1966
- (10) GREENWOOD, B.M. and VOLLER, A.
Suppression of autoimmune disease in New Zealand mice
associated with infection with malaria.
Clin. Experimental Immunology 8, 793-815 (1970)
- (11) GREENWOOD, B.M., MULLER, A.S. and VALKENBURG, H.A.
Rheumatoid factor in Nigerian sera.
Clin. Exp. Immunol., 9, 161-173 (1971)
- (12) HEILMEYER, L.
Blut und Blutkrankheiten. In: Schwiegk, H. (Hrsg.)
Handbuch der Inneren Medizin, Bd. II, 5. Aufl.,
Springer-Verlag, Berlin 1967
- (13) JACOBS, H.R.
A consideration of the antierythrocytic factors in
resistance to malaria.
Quart. Bull. Northwestern Univ. Med. School 21, 52-57
(1947)
- (14) JERNE, N.K. and NORDIN, A.A.
Plaque formation in agar by single antibody-producing
cells.
Science 140, 405 (1963)
- (15) KRETSCHMAR, W.
Die Abhängigkeit des Verlaufs der Nagetiermalaria
(Plasmodium berghei) in der Maus von exogenen Faktoren
und der Wahl des Mäusestammes. III. Plasmodien- und
Mäusestämme.
Z. Versuchstierk. 4, 46-56 (1964)
- (16) MAEGRAITH, B.G.
Pathological Processes in Malaria and Blackwater Fever.
Blackwell, Oxford 1948

- (17) McGHEE, R.B.
An autoimmune reaction produced in ducklings in response to the injection of duck embryo blood infected with Plasmodium lophurae.
J. Infect. Diseases 107, 410-418 (1960)
- (18) NAUCK, E.G.
Lehrbuch der Tropenkrankheiten.
3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1967
- (19) ROLLO, J.M.
Drugs used in the chemotherapy of malaria.
In: Goodman, L.S. and Gilman, A., eds. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4th edn.
The Macmillan Company, New York 1970, pp. 1095-1143
- (20) ROSENBERG, E.B., STRICKLAND, G.T., SEN LIAN YANG and WHALEN, E.
IgM Antibodies to red cells and autoimmune anemia in patients with malaria.
Amer. J. trop. Med. Hyg. 22, 146-152 (1973)
- (21) SCHNITZER, B., SODEMAN, T., HEAD, M.L., CONTACOS, P.G.
Pitting function of the spleen in malaria: ultrastructural observations.
Science 177, 175-177 (1972)
- (22) STERZL, J. and RIHA, J.
Detections of cells producing 7S antibodies by the plaque technique.
Nature 208, 858 (1965)
- (23) SRUMIA, M.M., SAMPLE, A.B., HART, E.D.
An improved microhematocrit method.
Amer. J. clin. Path., 24, 1016-1024 (1954)
- (24) TALIAFERRO, W.H. and MULLIGAN, H.W.
The histopathology of malaria, with special reference to the function and origin of the macrophages in defence.
Indian Med. Res. Mem. 29, 1-138 (1937)

- (25) TERZIAN, I.
Studies on Plasmodium lophurae, a malarial parasite
in fowls. I. Biological characteristics.
Amer. J. Hyg. 33, 1-22 (1941)
- (26) VOLLER, A.
Immunopathology of malaria.
WHO/MPD/SMR/73.6 und Bull. Wld. Hlth. Org. Im Druck
- (27) WELLS, J.V.
Immunological studies in tropical splenomegaly syndrome.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 64, 531-546 (1970)
- (28) WOODRUFF, A.W.
Mechanisms involved in anemia associated with infection
and splenomegaly in the tropics.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 67, 313-325 (1973)
- (29) ZUCKERMAN, A.
Autoimmunization and other types of indirect damage to
host cells as factors in certain protozoan diseases.
Exptl. Parasit. 15, 138-183 (1964)
- (30) ZUCKERMAN, A.
Autoantibody in rats with Plasmodium berghei.
Nature 185, 189-190 (1960)
- (31) ZUCKERMAN, A. and SPIRA, D.
Blood loss and replacement in plasmodial infections.
V. Positive antiglobulin tests in rat anemias due to
the rodent malarias Plasmodium berghei and Plasmodium
vinckeii, to cardiac bleeding, and to treatment with
phenylhydrazine hydrochloride.
J. Inf. Diseases 108, 339-348 (1961)

VERWENDETE MEDIEN

Dulbeccos PBS:

Lösung A (konz. x 10)

NaCl	8,09 g
KCl	0,29 g
KH_2PO_4	0,29 g
NaH_2PO_4	1,159g
Aqua dest. ad 80 ml	

Lösung B (nicht konz.)

CaCl_2	0,19 g
Aqua dest. ad 100 ml	

Lösung C (nicht konz.)

$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,19 g
Aqua dest. ad 100 ml	

Gey's - Lösung:

Lösung A (konz. x 10)

NaCl	70,0 g
KCl	3,7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	3,01 g
KH_2PO_4	0,237g
Glucose	10,0 g
Phenolrot	0,1 g
Aqua dest. ad 1 l	

Lösung B (nicht konz.)

$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,42 g

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,14 g

CaCl_2 0,34 g

Aqua dest. ad 100 ml

Lösung C (nicht konz.)

NaHCO_3 2,25 g

Aqua dest. ad 100 ml

Tabelle 1

Plasmodium vinckei in NMRI-Mäusen.

Infektionsquote zu verschiedenen Zeitabständen pi.

<u>P. vinckei</u> <u>Stamm</u>	<u>Tage pi.</u>	<u>Tiere</u> <u>positiv/infiz.</u>
VR	15	5 / 5
	27	2 / 5
	34	0 / 5
	38	0 / 5
	55	1 / 5
	66	0 / 5
	73	3 / 4
	80	0 / 5
	87	0 / 3
	94	1 / 5
VP	20	4 / 5
	32	0 / 5
	39	1 / 5
	48	0 / 5
	60	1 / 5
VRU	19	4 / 4
	26	4 / 4
	40	4 / 4
	47	3 / 4
	56	0 / 4

Tabelle 2

Infektion mit VP-Stamm - Versuch 1. PMZ-Werte am 31. Tag p.i.

<u>PMZ</u>	mit Erythrozyten aus kranken Tieren			mit Erythrozyten aus gesunden Tieren		
	N	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	f		$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	f
kranke Tiere	5	$17,6 \pm 5,0$	22,0	5	$10,6 \pm 2,6$	3,8
gesunde Tiere	5	$0,8 \pm 0,4$		5	$2,8 \pm 0,8$	
P		$<0,05$			$<0,05$	

<u>PMZ</u>	mit Erythrozyten aus kranken Tieren			mit Erythrozyten aus gesunden Tieren		
	N	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	f		$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	f
kranke Tiere	5	$79,4 \pm 3,9$	22,0	5	$57,0 \pm 2,7$	2,3
gesunde Tiere	5	$7,8 \pm 1,0$		5	$23,8 \pm 5,4$	
P		$<0,05$			$<0,05$	

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$r = \frac{\text{PMZ kranker Tiere}}{\text{PMZ gesunder Tiere}}$$

Tabelle 3

Infektion mit VP-Stamm - Versuch 2.

Infektions- dauer (Tage)	DFMZ			IPMZ			P
	n	$\bar{x} \pm S x$	f	N	$\bar{x} \pm S x$	f	
13	5	$6,6 \pm 0,8$	1,7	5	$1,6 \pm 0,8$	0,4	zu Kon- trollen in allen Fällen > 0,05
25	5	$4,6 \pm 0,9$	1,2	4	$2,5 \pm 0,9$	0,6	
32	5	$2,0 \pm 0,7$	0,6	5	$3,0 \pm 0,8$	0,7	
40	5	$4,2 \pm 1,3$	1,1	5	$4,6 \pm 0,9$	1,2	
52	5	$3,6 \pm 1,0$	0,9	4	$5,5 \pm 2,2$	1,3	
Kontrollen	6	$3,8 \pm 1,3$		5	$4,4 \pm 0,6$		

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{FMZ kranker Tiere}}{\text{FMZ Kontrollen}}$$

Tabelle 4

Infektion mit VR-Stamm - Versuch 1. PMZ am 26. Tag pi.

<u>DPMZ</u>	mit Erythrozyten aus kranken Tieren		mit Erythrozyten aus gesunden Tieren	
	$N \quad \bar{x} \pm S \quad \bar{x}$	f	$N \quad \bar{x} \pm S \quad \bar{x}$	f
kranke Tiere	5 $8,4 \pm 3,5$	6,0	5 $2,6 \pm 0,9$	6,5
gesunde Tiere	5 $1,4 \pm 0,9$		5 $0,4 \pm 0,4$	
P	<0,05		<0,05	

<u>IPMZ</u>				
kranke Tiere	5 $13,8 \pm 8,3$	3,0	5 $4,4 \pm 1,5$	3,7
gesunde Tiere	5 $4,6 \pm 1,5$		5 $1,2 \pm 1,1$	
P	<0,05		<0,05	

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{PMZ kranker Tiere}}{\text{PMZ gesunder Tiere}}$$

Tabelle 5

Infektion mit VR-Stamm - Versuch 2.

Infektions- dauer (Tage)	DPMZ			IPMZ			P zu Kontrollen
	N	$\bar{x} + S x$	f	N	$\bar{x} + S x$	f	
12	5	$3,6 \pm 0,6$	0,4	5	$6,2 \pm 0,9$	0,9	$<0,05$ (DPMZ)
19	5	$6,6 \pm 2,2$	0,8	5	$7,4 \pm 1,6$	1,0	$>0,05$
32	5	$44,8 \pm 5,3$	5,2	5	$40,6 \pm 2,9$	5,6	$<0,05$
Kontrollen	5	$8,6 \pm 1,6$		5	$7,2 \pm 2,2$		

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{PMZ kranker Tiere}}{\text{PMZ Kontrollen}}$$

Tabelle 6

Infektion mit VR-Stamm - Versuch 3.

Infektions- dauer (Tage)	DPMZ				IPMZ				P zu
	N	$\bar{x} \pm S$	$\bar{x}$	f	N	$\bar{x} \pm S$	$\bar{x}$	f'	Kontrollen
15	5	38,0 $\pm$ 3,2	3,6	5	108,2 $\pm$ 16,2	7,0	<0,05 (DPMZ)		
27	5	37,0 $\pm$ 5,3	3,5	5	110,2 $\pm$ 16,2	7,0	<0,05 (DPMZ)		
34	5	4,4 $\pm$ 0,8	4,2	5	12,6 $\pm$ 2,7	0,8	>0,05		
38	5	7,4 $\pm$ 2,4	0,7	5	10,4 $\pm$ 2,2	0,7	>0,05		
55	3	5,3 $\pm$ 1,8	0,5	3	15,6 $\pm$ 2,6	-	<0,05 (DPMZ)		
Kontrollen	6	10,5 $\pm$ 1,5	-		nicht aus- wertbar				

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{DPMZ kranker Tiere}}{\text{DPMZ Kontrollen}}$$

$$f' = \frac{\text{IPMZ kranker Tiere}}{\text{IPMZ Gruppe 55 Tage pi.}}$$

Tabelle 7

Infektion mit VR-Stamm - Versuch 4.

Infektions- dauer (Tage)	DPMZ				IPMZ				P zu Kontrollen
	N	$\bar{x} \pm S$	$\bar{x}$	f	N	$\bar{x} \pm S$	$\bar{x}$	f	
66	5	3,2 $\pm$ 1,0		1,1	5	1,8 $\pm$ 0,2		1,1	>0,05
73	5	3,4 $\pm$ 0,8		1,2	5	1,0 $\pm$ 0,5		0,6	>0,05
80	5	7,6 $\pm$ 1,0		2,7	5	9,8 $\pm$ 2,1		6,1	<0,05
87	5	3,8 $\pm$ 0,3		1,4	5	4,2 $\pm$ 1,6		2,6	>0,05
94	5	2,8 $\pm$ 0,7		1,0	5	2,6 $\pm$ 0,8		1,6	>0,05
Kontrollen	5	2,8 $\pm$ 0,6			5	1,6 $\pm$ 0,2			

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{FMZ kranker Tiere}}{\text{FMZ Kontrollen}}$$

Tabelle 8

Infektion mit VRU-Stamm - Versuch 1.

PMZ am 15. Tag pi.

<u>PMZ</u>	mit Erythrozyten aus kranken Tieren			mit Erythrozyten aus gesunden Tieren		
	N	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	f	N	$\bar{y} \pm S_{\bar{y}}$	f
kranke Tiere	4	$11,0 \pm 2,8$	6,1	4	$25,5 \pm 2,9$	2,7
gesunde Tiere	4	$1,8 \pm 0,6$		4	$8,8 \pm 2,1$	
P		$<0,05$			$<0,05$	

<u>IFMZ</u>						
kranke Tiere	4	$15,0 \pm 3,0$	5,4	4	$32,3 \pm 10,0$	2,4
gesunde Tiere	4	$2,8 \pm 0,5$		4	$15,5 \pm 1,6$	
P		$<0,05$			$<0,05$	

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{PMZ kranker Tiere}}{\text{PMZ gesunder Tiere}}$$

Tabelle 9

Infektion mit VRU-Stamm - Versuch 2.

Infektions- dauer (Tage)	DPMZ			IPMZ			P zu Kontrollen
	N	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	f	N	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	f	
19	5	$1,2 \pm 0,6$	3	6	$0,8 \pm 0,3$	1,3	$<0,05$
26	5	$0,6 \pm 0,4$	1,5	5	0		$>0,05$
36	5	$1,0 \pm 0,6$	2,5	5	0		$>0,05$
47	5	$0,2 \pm 0,2$	0,5	5	0		$>0,05$
56	5	$0,6 \pm 0,4$	1,5	5	$0,2 \pm 0,2$	0,3	$>0,05$
Kontrollen	5	$0,4 \pm 0,2$		5	$0,6 \pm 0,4$		

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{PMZ kranker Tiere}}{\text{PMZ Kontrollen}}$$

Tabelle 10

Infektion mit VRU-Stamm - Versuch 3.

Infektions- dauer	(Tage)	PMZ		f	
		N kranke Tiere	N gesunde Tiere		
		$\bar{x} \pm s \bar{x}$	$\bar{x} \pm s \bar{x}$		
10	5	1,0 $\pm$ 0,6	5 1,8 $\pm$ 0,6	,4	> 0,1
12	5	0,4 $\pm$ 0,2	10 2,7 $\pm$ 0,8	,4	> , -
14	5	1,0 $\pm$ 0,3	6 0,2 $\pm$ 0,2	, -	< , -
17	4	2,3 $\pm$ 0,6	5 2,0 $\pm$ 0,6	, -	> ,0
19	4	0,5 $\pm$ 0,5	6 0,2 $\pm$ 0,2	, -	> ,0
21	4	1,3 $\pm$ 0,8	4 5,3 $\pm$ 2,0	,0	< , -

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{PMZ kranker Tiere}}{\text{PMZ gesunder Tiere}}$$

Tabelle 11

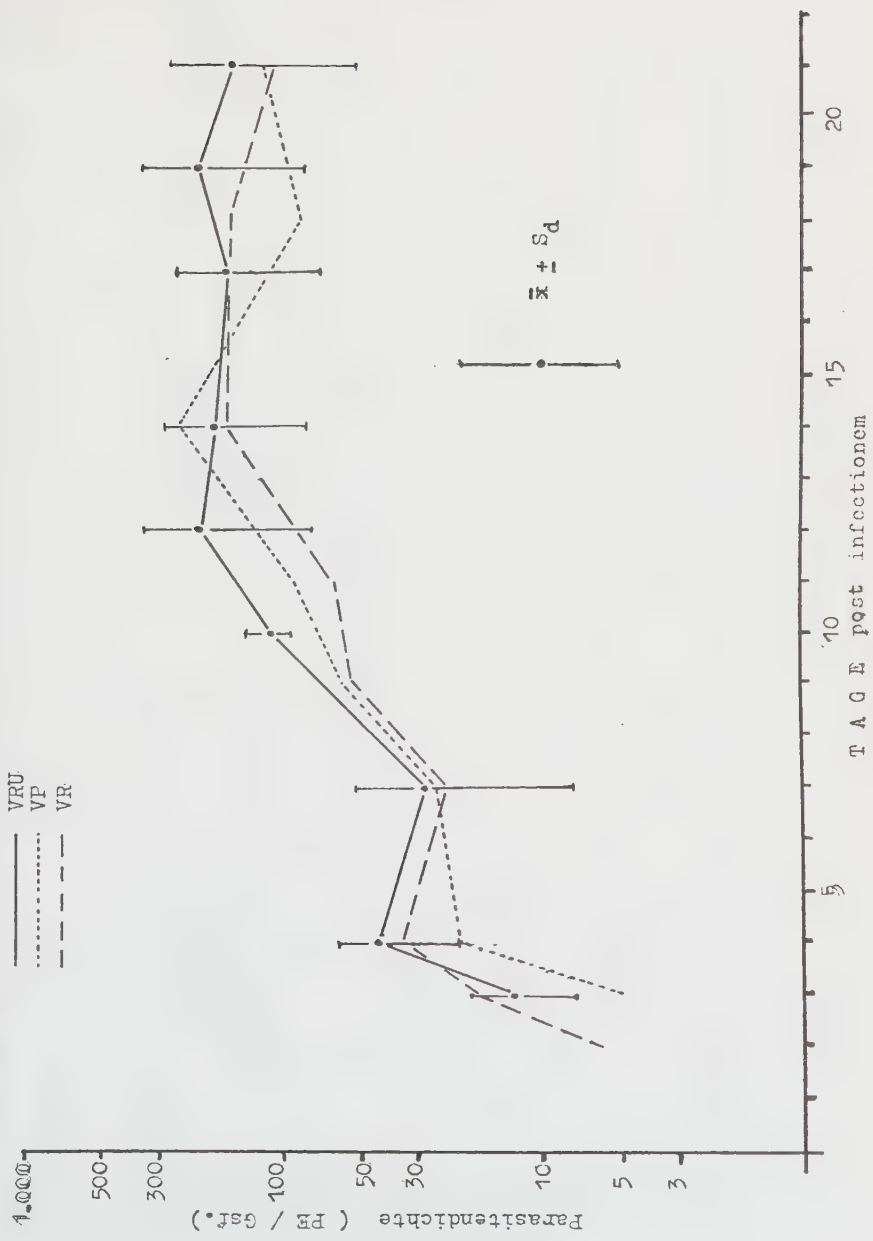
Infektion mit VRU-Stamm - Versuch 3.

Infektions- dauer (Tage)	IFMZ		f	P
	N	kranke Tiere $\bar{x} \pm S \bar{x}$	N	gesunde Tiere $\bar{x} \pm S \bar{x}$
10	5	3,4 $\pm$ 1,0	5	2,0 $\pm$ 0,5
12	5	0,8 $\pm$ 0,6	6	0,3 $\pm$ 0,2
14	5	0,6 $\pm$ 0,4	5	0,2 $\pm$ 0,2
17	5	2,4 $\pm$ 0,7	5	0,5 $\pm$ 0,5
21	4	3,8 $\pm$ 0,9	4	9,0 $\pm$ 2,7
				1,7
				2,6
				3,0
				4,8
				0,4

N = Anzahl der ausgewerteten Platten

$$f = \frac{\text{PMZ kranker Tiere}}{\text{PMZ gesunder Tiere}}$$

Abbildung 1. Parasitämie in NMRI-Mäusen nach der Infektion mit Plasmodium vinckei
(verschiedene Stämme)



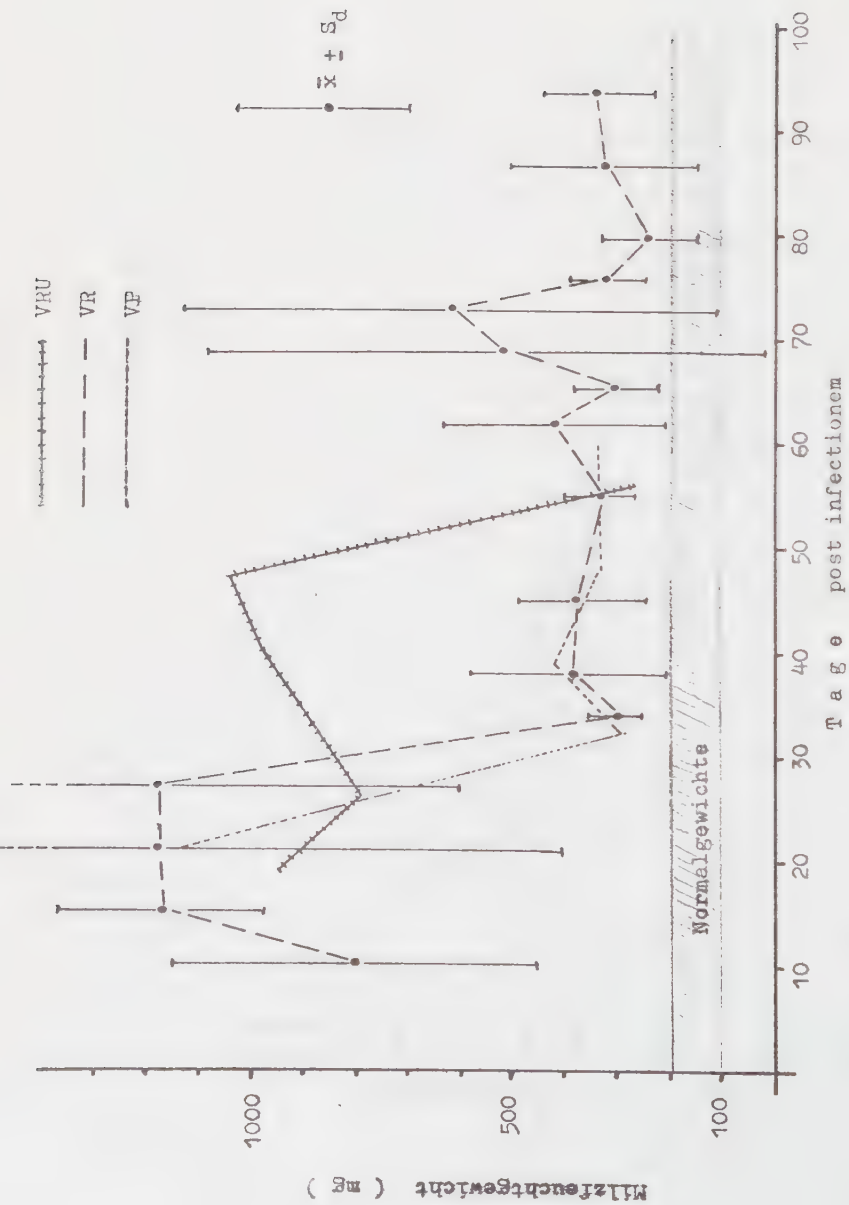


Abbildung 2

Milzfeuchtgewichte bei der Infektion von NMRI-Mäusen mit P. vinckei (verschiedene Stämme)

Abbildung 3

Hämatokrit bei der Infektion von NMRI-Mäusen mit P. vinckei (verschiedene Stämme)

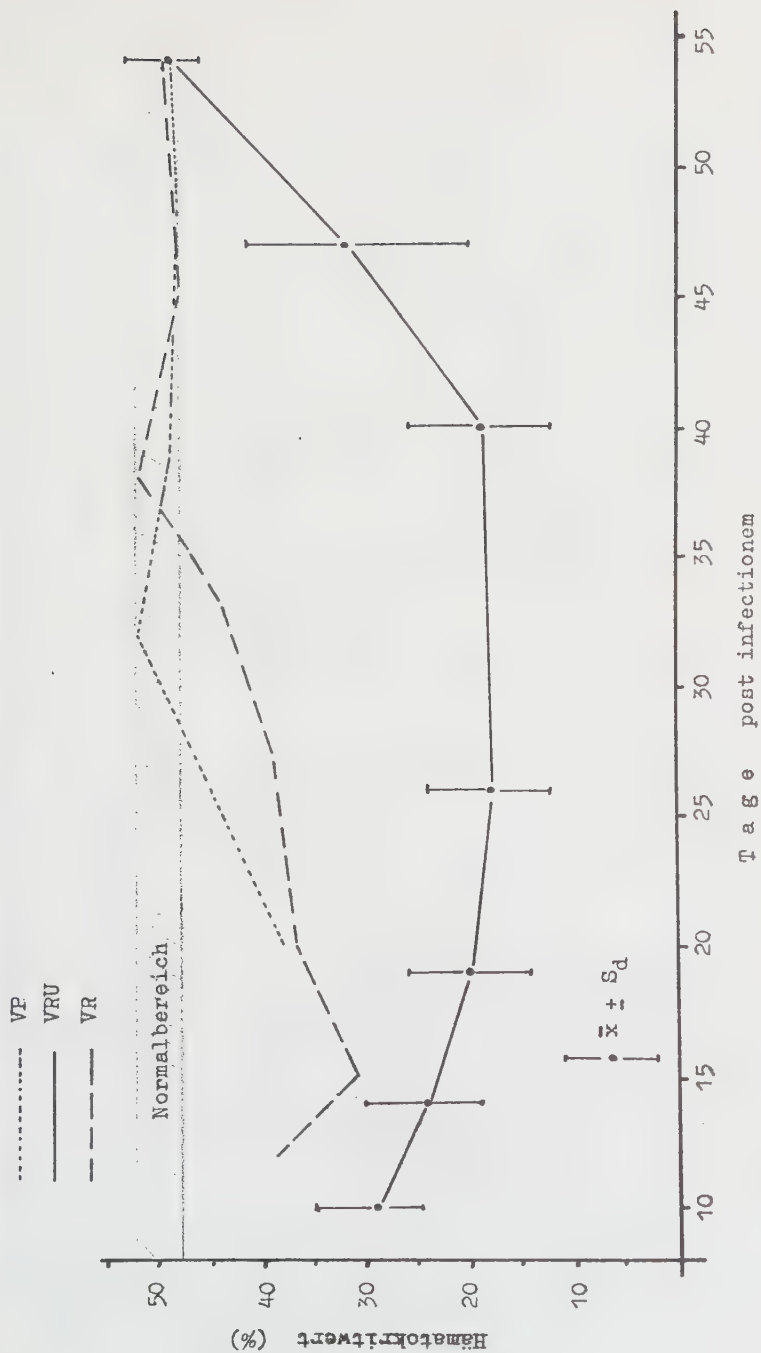
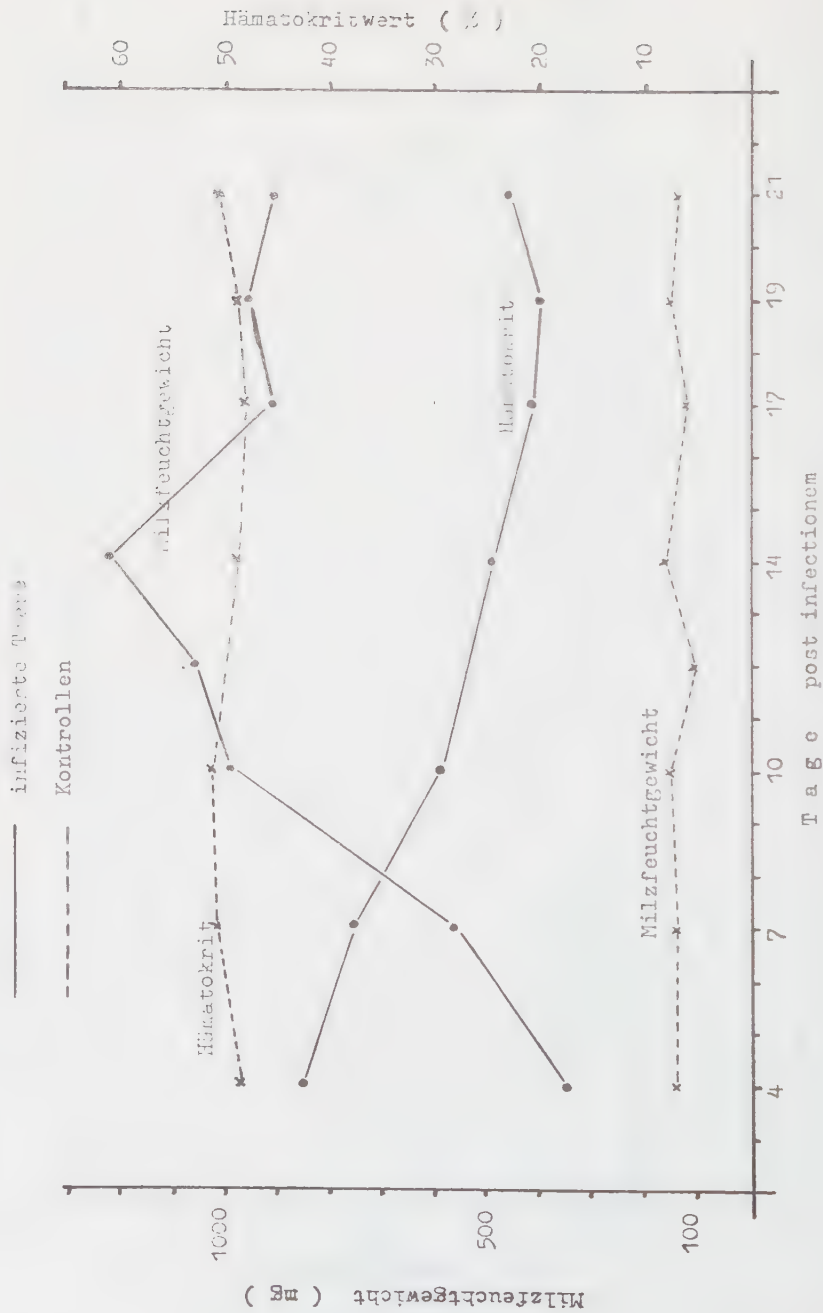


Abbildung 4

Hämatokrit und Milzfeuchtgewicht bei der Infektion von Ratten mit P. vinckei (s. auch VRU)

Versuch 3



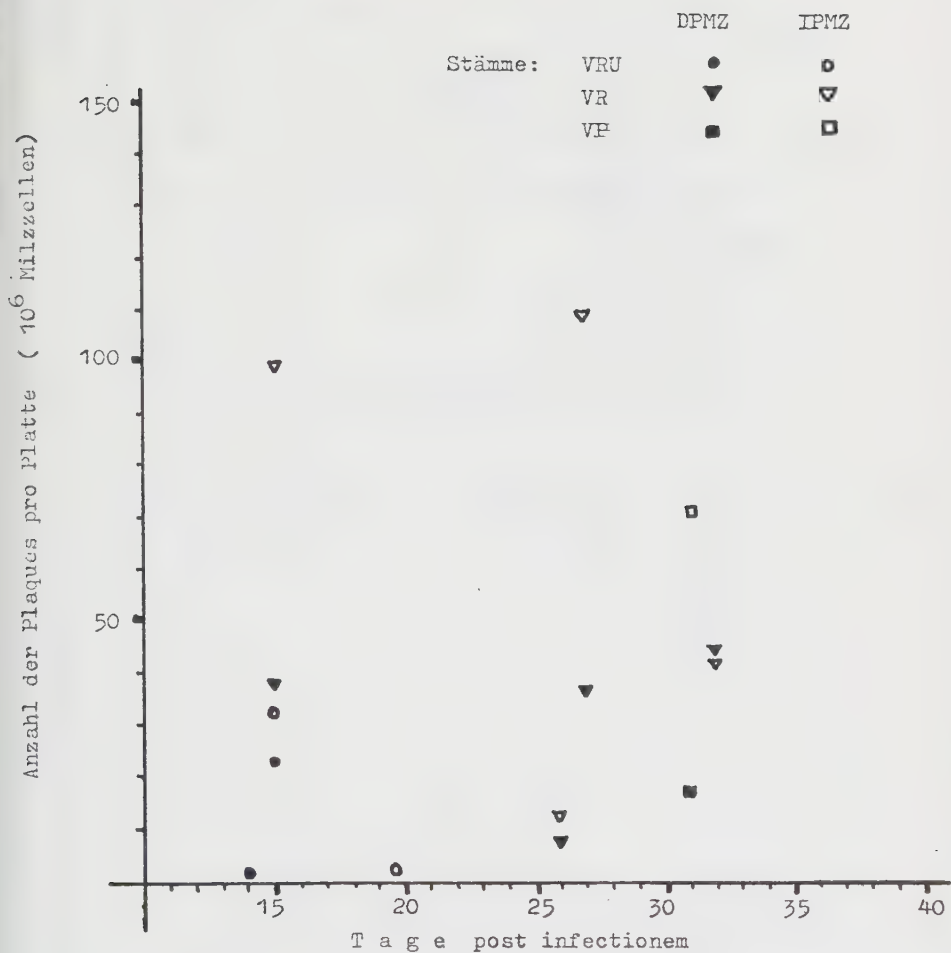
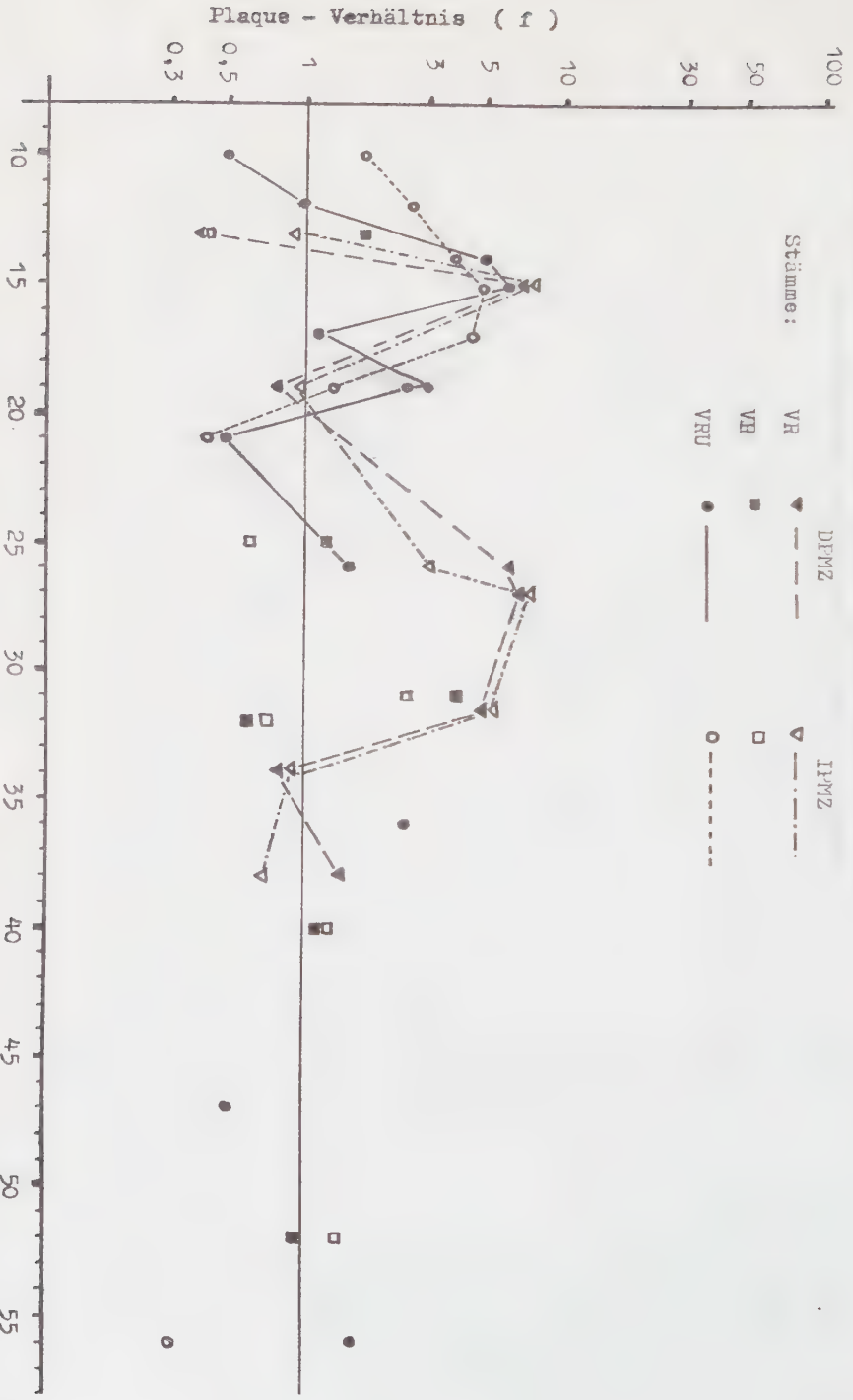


Abbildung 5

Direkt (DPMZ) und indirekt (IPMZ) plaquebildende Milzzellen bei der Infektion von NMRI-Mäusen bei der Infektion mit *Plasmodium vinckei* (verschiedene Stämme)

Abbildung 6. Direkt (DMZ) und indirekt (IMZ) plaquebildende Milzzellen bei der Infektion

von NRRL-Mäusen mit Plasmodium vinckei (verschiedene Stämme)



Herrn Prof. Dr. med. F. Scheiffarth danke ich ergebenst für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor. Bei Herrn Prof. Dr. O. Dann bedanke ich mich für die Einwilligung, den tierexperimentellen Teil der Untersuchungen im Biologischen Prüfungslabor durchführen zu dürfen.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. H.W. Baenkler bin ich für Rat und Hilfe bei der Durchführung der Versuche und der Abfassung der Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Frau G. Fischer, Frau B. Regler und Herrn P. Mincea danke ich für zuverlässige technische Assistenz.

Lebenslauf

Am 19.9.1935 wurde ich, Ernst Fink, als Sohn des Forstmeisters Heinrich Fink und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Feicht, in München geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Lohr/Main und Feucht/Nbg. trat ich 1946 in das Neue Gymnasium in Nürnberg ein, wo ich 1954 das Abitur ablegte.

Von 1954 bis 1960 studierte ich Biologie, Chemie und Erdkunde an den Universitäten München und Erlangen und legte 1960 das Staatsexamen für das Höhere Lehramt in den genannten Fächern ab.

Nach der Referendarzeit von 1960 - 1962 wurde ich 1963 in den Fächern Zoologie, Botanik und Chemie zum Dr. rer. nat. promoviert.

Von 1965 bis 1971 studierte ich Medizin an der Universität Erlangen - Nürnberg und legte dort 1971 das Medizinische Staatsexamen ab. Im Frühjahr 1973 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Seit 1964 bin ich am Institut für Angewandte Chemie der Universität Erlangen, Direktor Prof. Dr. Otto Dann, als Leiter des Biologischen Prüfungslaboratoriums tätig.

Am 27.5.1966 heiratete ich Gisela Kurkhaus; am 15.10.1969 wurde unsere Tochter Barbara, am 24.1.1972 unsere Tochter Julia geboren.

